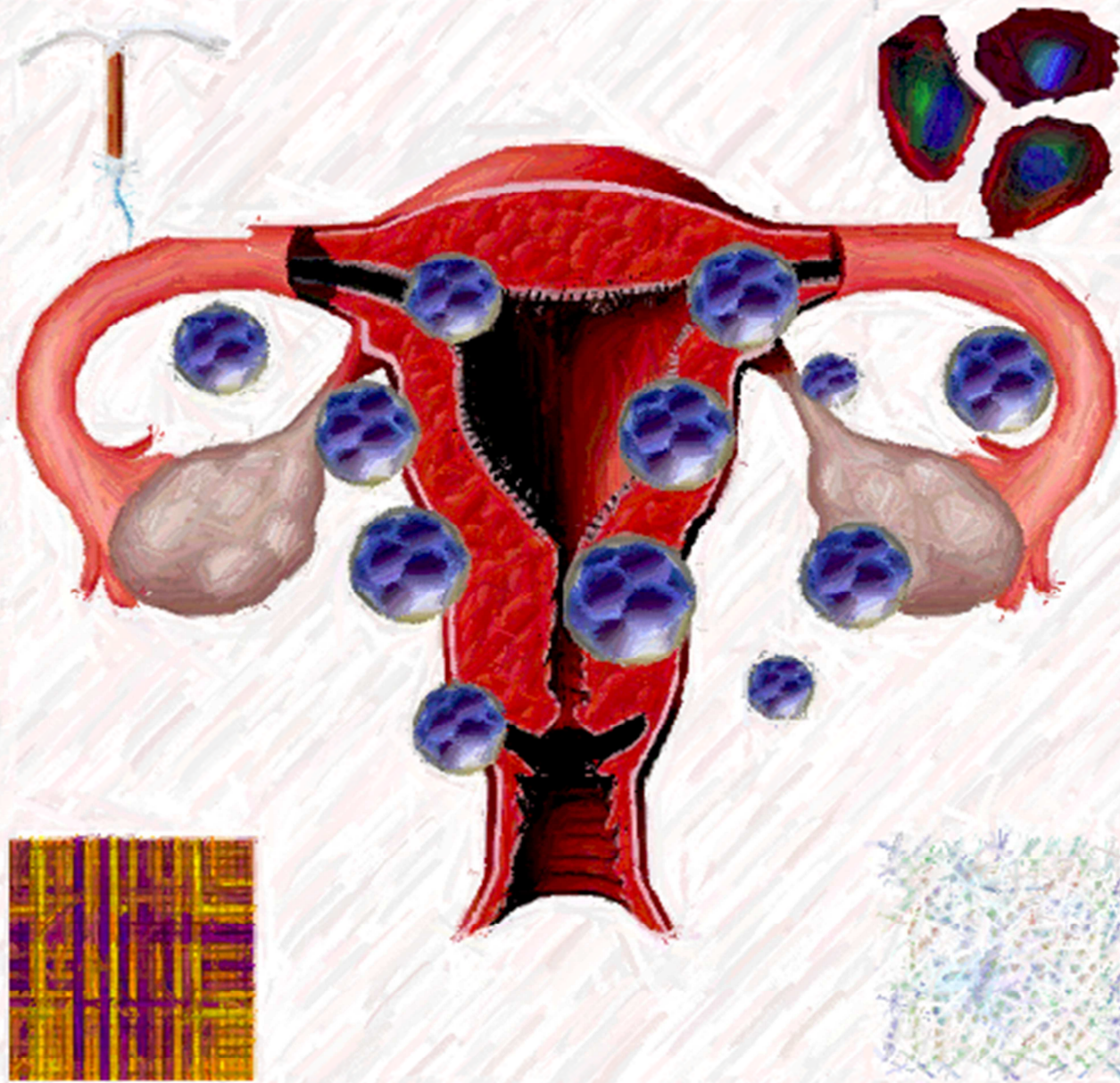


# *FIRMA MOLECULAR DE LA RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL EN HUMANOS: APLICACIÓN EN INVESTIGACIÓN Y CLÍNICA*



*JOSÉ PEDRO CARRASCOSA DE LA BLANCA*  
*2017*

Firma Molecular de la Receptividad Endometrial en Humanos:  
Aplicación en Investigación y Clínica. José P. Carrascosa 2017







**Universidad Pablo de Olavide**  
**Centro Andaluz de Biología del Desarrollo**  
**Departamento de Biología Molecular e**  
**Ingeniería Bioquímica**

## **Tesis Doctoral**

# **Firma Molecular de la Receptividad Endometrial en Humanos: Aplicación en Investigación y Clínica**

**José Pedro Carrascosa de la Blanca**  
Tesis doctoral  
Sevilla, 2017





**Universidad Pablo de Olavide**  
**Centro Andaluz de Biología del Desarrollo**  
**Departamento de Biología Molecular e Ingeniería**  
**Bioquímica**

***Firma molecular de la receptividad endometrial en  
humanos: aplicación en investigación y clínica***

Memoria de tesis presentada por  
**JOSÉ PEDRO CARRASCOSA DE LA BLANCA,**  
Licenciado en Biología por la Universidad de Granada, Granada,  
para optar al **GRADO DE DOCTOR**

El Director  
José Antonio Horcajadas Almansa  
Profesor Titular del Departamento de Biología Molecular e Ingeniería  
Bioquímica del Área de Genética  
Sevilla





**D. JOSÉ ANTONIO HORCAJADAS ALMANSA**, DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA BIOQUÍMICA DEL ÁREA DE GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE DE SEVILLA

### **CERTIFICA**

que el trabajo de investigación que lleva por título “Firma molecular de la receptividad endometrial en humanos: aplicación en investigación y clínica” ha sido realizado por el licenciado **D. JOSÉ PEDRO CARRASCOSA DE LA BLANCA** bajo su dirección y que reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad Pablo de Olavide.

Y para que conste, firmo la presente en Sevilla, a 10 de Noviembre de 2017.

Fdo. Dr. José Antonio Horcajadas Almansa





## AGRADECIMIENTOS

Es de bien nacido ser agradecido, es por ello que en primer lugar me gustaría agradecer a mi tutor de la tesis doctoral, el Dr. José Antonio Horcajadas Almansa, por haberme transmitido tantos conocimientos y la pasión por el mundo de la reproducción asistida. Pero, más importante que la ciencia, gracias por ser un amigo en el que poder confiar y con el cual he compartido tantos buenos momentos fuera del trabajo.

Gracias al Dr. José Antonio Sánchez Alcázar por permitirme instalarme en su laboratorio para desarrollar mi trabajo, además de apoyarme y facilitarme todo lo que ha estado a su alcance. Gracias a Ana, Marina, Alex, Isa, Manuel, David, Mónica, Mario e Inma, mis compañeros de laboratorio, por hacerme sentir cómo en casa y hacer que trabajar con todos vosotros fuera un auténtico placer.

A todo el personal del CABD, José y Vanesa de conserjería, a todos los técnicos, estudiantes predoctorales, post-doctorales e investigadores. Gracias a todo el personal de cocina y de limpieza por estar siempre pendientes de nuestras necesidades, y a Pachú por todas las risas que nos echábamos a diario. Gracias al laboratorio de Proteómica y de Microbiología por haberme dejado utilizar vuestros equipos y por la ayuda recibida para poder utilizarlos sin prenderles fuego.

A mis amigos de Biología y de Granada por haber hecho de la época universitaria el momento de la vida más loco, divertido e inspirador. Gracias a Estela, Yurena, Pepe, Antonio Alba, Lourdes, Miguel, Marian y Salvador por todos los viajes, momentos de estudio y misas de las 7 en el Perro. Especial mención a José e Isa que me acompañaron después en mis años Sevillanos de Máster y doctorado, acogiéndome en su casa cuando me ha hecho falta.

A todos mis amigos de Úbeda, porque si soy la persona que soy hoy en día es gracias a vosotros. A Marisa por estar a las duras y a las maduras, no existen palabras de agradecimiento suficientes. A Nono porque aunque es un manipulador siempre está de buen humor. A los Arjonillas por ser un ejemplo con su dedicación en lo personal y profesional. A Celia por haber compartido tantos instantes por toda Europa, viva Videy. A Elena, por esas risas que alegran a cualquiera. A todos los demás, Javis, Charles, Alfonso, Rafa, Inma, Urdiales, Tito, Paco, Juanjo etc, por ser los perfectos compañeros de este viaje que es la vida. A los ochios, la Alcázar, y a Úbeda en general.

A mi familia, tanto a mis titos y primos de Madrid como los de Úbeda, por haberme apoyado y creído en mí siempre. A mis padres, a quienes les debo absolutamente todo, gracias por ser un gran ejemplo, seguramente no seáis los padres perfectos, pero si los mejores que he podido tener. Gracias por ser un gran soporte y animarme en los estudios, el trabajo y en todas las aventuras que he realizado. A mi hermano, quién es un auténtico autodidacta y con el que he aprendido lo divertido que es aprender por curiosidad.

Por último me gustaría agradecer a Reprogenetics (Nueva Jersey, Estados Unidos), SINAIE (Sevilla, España), y a las clínicas OriginElle (Montreal, Canada) y IVF-Spain (Alicante, España) por haber financiado estos proyectos y hacerlos viables. Así como a la clínica Ginemed (Sevilla, España) y IVF-Spain por haber recolectado las muestras necesarias para poder trabajar. A IGLS por haber trabajado con nosotros profundamente en este proyecto y continuarlo para poder desarrollar un nuevo test genético de diagnóstico de receptividad endometrial. Y, por supuesto, a todas las pacientes que han donado un pedacito de sí mismas de manera desinteresada permitiendo el avance de la ciencia.



# ÍNDICE

<b>1. ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
2.1. Dispositivo intrauterino (DIU).....	17
2.1.1. Breve historia del DIU. ....	17
2.1.2. Tipos de DIU .....	18
2.1.3. DIU de cobre.....	19
2.1.4. Efectos sobre el tejido endometrial.....	21
2.2. Muerte celular .....	23
2.2.1. Tipos de muerte celular .....	23
2.2.2. Apoptosis .....	25
2.2.3. Red de microtúbulos apoptóticos .....	26
2.3. El endometrio .....	28
2.3.1. Definición .....	28
2.3.3. Ciclo menstrual .....	32
2.4. Receptividad endometrial.....	33
2.4.1 Definición .....	33
2.4.2. Marcadores de receptividad endometrial.....	35
2.4.2.1. Marcadores histológicos.....	35
2.4.2.2. Marcadores moleculares .....	36
2.4.2.3. MicroRNA.....	37
2.4.2.4. Marcadores “ómicos”.....	37
2.5. Técnicas utilizadas en transcriptómica .....	39
2.5.1. Microarrays de expresión génica.....	39
2.5.2. Secuenciación masiva (NGS).....	41
2.5.3. PCR cuantitativa en microfluidos.....	42
2.5.4. Gene Ontology (GO) .....	44
2.6. Test de receptividad endometrial actuales .....	45
2.6.1. E-Tegrity .....	46
2.6.2. Endometrial Function Test (EFT).....	47

.....	48
2.6.3. Endometrial Receptivity Array (ERA).....	48
2.7. Contexto científico actual .....	49
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>57</b>
<b>5. DISEÑO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>61</b>
.....	66
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
6.1. Recolección de muestras .....	69
6.2. Separación de epitelio y estroma y cultivo celular .....	70
6.3. Inmunofluorescencia .....	70
6.4. Citometría de flujo .....	71
6.5. Selección de genes de receptividad endometrial.....	72
6.6. Análisis funcional .....	72
6.7. Diseño de oligonucleótidos y validación .....	73
6.8. Aislamiento de RNA total .....	75
6.8.1 Células endometriales estromales en cultivo.....	75
6.8.2 Biopsias endometriales .....	75
6.9. Extracción de exosomas y purificación de RNA total.....	76
6.10. PCR cuantitativa en microfluidos.....	77
6.11. Análisis de los datos obtenidos por PCR cuantitativa .....	78
6.12. Análisis de componentes principales (PCA) .....	78
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
7.1. Efecto de la decidualización y el tratamiento con cobre sobre las células endometriales estromales humanas (HESC).....	83
7.2. Formación del AMN durante la apoptosis celular en dHESC.....	85
7.3. Selección de marcadores de receptividad endometrial y respuesta inmunológica en el endometrio humano.....	86
7.4. Ontología génica e interacciones proteicas .....	94
.....	96
7.5. Selección y validación de las parejas de oligonucleótidos para los 192 genes WOI.....	96
7.6. Análisis de calidad de qPCR en microfluidos .....	98



7.7. Efecto del cobre en genes de receptividad endometrial y de respuesta inmunológica.....	100
7.8. Análisis de componentes principales (PCA) .....	103
.....	104
7.9. Diferencias en expresión génica de los 192 genes WOI en ciclo natural	104
7.10. Diferencias en la expresión de los genes WOI en ciclos naturales y sustituidos.....	105
7.11. Selección de genes para la elaboración de una herramienta molecular para la evaluación de la receptividad endometrial.....	106
7.12. Análisis de agrupación de muestras según clasificación de estadio de receptividad endometrial .....	107
7.13. Diferencias en expresión génica de los 192 genes WOI en biopsias líquidas .....	110
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>111</b>
<b>9. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>129</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>133</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>137</b>
<b>12. ANEXOS .....</b>	<b>155</b>
ANEXO I. Proyecto de investigación del desarrollo de una nueva herramienta de diagnóstico de receptividad endometrial aprobado por el comité ético del Centro Hospitalario Universitario Virgen del Rocío.....	157
ANEXO II. Consentimiento informado para participar en el estudio.....	158
ANEXO III. Secuencia de los oligonucleótidos forward y reverso de los 192 genes de la WOI .....	160
Anexo IV. Validación de los oligonucleótidos diseñados por PCR. Se indica el nombre del gen amplificado, la temperatura de hibridación (TH) teórica, la TH validada, la longitud del producto de PCR (amplicón). .....	164
ANEXO V. Pares de oligonucleótidos diseñados por GeneFisher 2.6 para los genes no validados. ....	167
ANEXO VI. URL de las direcciones web utilizadas en la tesis doctoral .....	169
ANEXO VII. Publicaciones del doctorando.....	170
ANEXO VIII. Comunicaciones a congresos relacionados con la tesis .....	171



# 1. ABREVIATURAS



---

AMN	Red de microtúbulos apoptóticos
ANGPT	Angiopoyetina
ASRM	American Society for Reproductive Medicine
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CPT	Camptotecina
DIU	Dispositivo intrauterino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario
ERA	Endometrial receptivity array
EFT	Endometrial function test
FIV	Fecundación in vitro
GO	Ontología génica
ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoide
IGFBP1	Factor de crecimiento insulínico de tipo 1
dHESC	células estromales de endometrio humano decidualizadas
HESC	células estromales de endometrio humano
LH	Hormona luteinizante
min	Minutos
NGS	Secuenciación masiva
P	Progesterona
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGD	Diagnóstico genético preimplantacional
PI	Yoduro de propidio
PRL	Prolactina
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
miRNA	Micro RNA
PB	Pares de bases
RNA-seq	Secuenciación del RNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno
qRT-PCR	PCR a tiempo real o PCR cuantitativa
SPN	Polimorfismo de nucleótido único
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TUNEL	Marcado de final de corte de dUTP de terminal deoxinucleotidil transferasa
WOI	Ventana de implantación





## 2. INTRODUCCIÓN



## **2.1. Dispositivo intrauterino (DIU)**

### **2.1.1. Breve historia del DIU.**

Los DIU son pequeños dispositivos anticonceptivos que se insertan en el útero, a menudo en forma de “T”, inertes o impregnados con cobre u hormonas. La historia del DIU es muy antigua. Se cuenta que el médico Hipócrates, hace unos 2.500 años, fue el precursor de este método, ya que descubrió el efecto anticonceptivo que se derivaba de la colocación de un cuerpo extraño en el interior del útero; preferentemente le introducía a sus pacientes una semilla de zanahoria salvaje, auxiliado por un tubo de plomo. Ciertas mujeres de las clases adineradas utilizaban unos “pesarios”, así se les denominaba a esos antiguos dispositivos intrauterinos que consistían en una esfera de oro de 18 mm de diámetro, que se insertaba en la vagina antes del acto sexual. No obstante, se considera que fueron los árabes los reales inventores del dispositivo intrauterino. Para evitar la preñez de las camellas, en las largas travesías por el desierto, les introducían semillas de dátiles o les colocaban un aro en el útero. Además, si querían utilizarlas más adelante para obtener descendencia, bastaba con retirarlas y la capacidad reproductiva se veía restablecida.

En 1909 el Dr. Richard Richter publicó el primer artículo sobre el uso del DIU, utilizando para ello DIUs hechos con los intestinos de gusanos de seda dejando unos extremos que sobresalía del cérvix para poder retirarlos cuando desearan (Richter , 1909). Veinte años más tarde, el Dr. Ernst Gräfenberg utilizó un DIU basado también en los intestinos de gusanos de seda pero con plata para poder ser detectado con rayos X (Gräfenberg, 1929). El mayor problema al que se enfrentaban era que debido a que todavía no se habían descubiertos los antibióticos, cualquier complicación a nivel de infección podía tener consecuencias muy graves.

En 1962 se celebró en Nueva York la primera conferencia sobre DIU en el que los mayores especialistas del campo presentaron sus resultados y debatieron sobre como disminuir los efectos secundarios. El Dr. Jack Lippes

presentó el DIU *Lippes Loop*, el primer DIU de plástico que utilizaba cordones de nylon en el cérvix para asegurar su localización y su retirada (Lippes, 1965).

Se produce también en la década de los 60 el diseño en forma de T para adaptarse más a la anatomía femenina y las invenciones de los DIU con cobre. Se descubrió que los DIU de cobre podían tener un tamaño menor sin disminuir su efectividad, disminuyendo, de esta manera, algunos efectos secundarios como los dolores pélvicos y el sangrado. Los DIUs de cobre modernos disponen el cobre en una superficie sólida tubular en vez de en hileras, aumentando su eficacia y su vida media. El desarrollo de los DIUs hormonales se produjo durante los años setenta en Finlandia, pero no fueron presentados hasta el año 1989. Su objetivo era disminuir algunos efectos secundarios como hipermenorrea, embarazo ectópico o, en algunos pocos casos, alergia al cobre. Los primeros dispositivos liberaban grandes cantidades de progesterona y de otras hormonas, cantidades que se han ido reduciendo en la actualidad sin verse comprometida su efectividad.

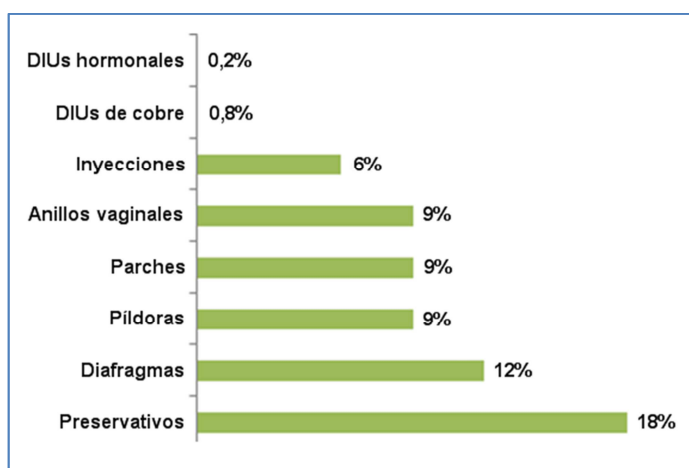
### **2.1.2. Tipos de DIU**

Los tres tipos de DIU más utilizados en la actualidad son: inertes, de cobre y liberadores de hormonas (Stanford y Mikolajczyk, 2002). Los modos de acción del DIU dependen del modelo. El mecanismo principal de los DIUs inertes es la reacción del endometrio ante un cuerpo extraño, lo que convierte en hostil el ambiente uterino para los espermatozoides y para la implantación embrionaria (Ortiz y Croxatto, 2007). El mecanismo de acción de los DIUs de cobre está basado en la liberación de iones de cobre y pueden ser clasificados dependiendo de cuando lo ejerza su acción, antes o después de la fertilización (World Health Organization Scientific Group, 1987). Los DIUs hormonales, por su parte, ejercen su acción liberando una pequeña cantidad de levonorgestrel, una progestina, cuyo principal mecanismo de acción es hacer del interior del útero un ambiente muy dañino para el espermatozoide (Speroff y Darney, 2001), reduciendo el



revestimiento endometrial y afectando negativamente a la implantación (Group, 2008; Robert y cols., 2011).

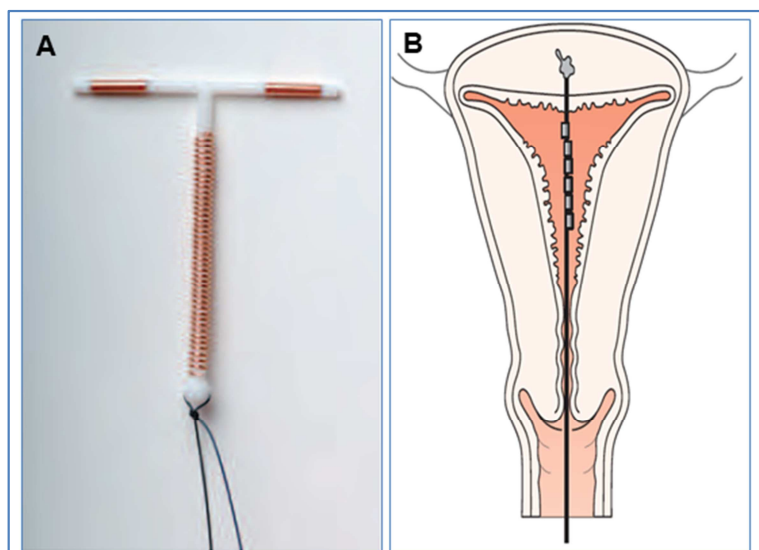
Los DIUs tienen la menor tasa de embarazo en el primer año de uso de entre los métodos anticonceptivos reversibles, menor al 1% (figura 1). Además, desde su colocación, los DIUs hormonales tienen una vida media de 3 a 5 años, y los DIUs de cobre de 10 a 12 años. Tienen una incidencia muy baja de efectos secundarios, siendo la expulsión involuntaria del dispositivo por el propio cuerpo, los dolores y los sangrados, los más comunes.



**Figura 1. Tasa de embarazo de diferentes métodos anticonceptivos durante su primer año de uso.** Extraído de Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, Estados Unidos).

### 2.1.3. DIU de cobre

Los DIUs de cobre son pequeños dispositivos de plástico con cobre alrededor de ellos. A menudo tienen forma de T (figura 2A) y son ubicados en el útero como método anticonceptivo (figura 2B). El modelo TCu 380A es el más seguro y efectivo de todos (Stanford y Mikolajczyk, 2002; Kulier y cols., 2006; d'Arcangues, 2007).



**Figura 2. Imagen del DIU de cobre y ubicación.** A. Fotografía de un DIU en forma de T con el cobre revistiéndolo en hileras. B. Esquema representativo de la ubicación del DIU de cobre en el aparato genital femenino.

Su tasa de embarazo durante el primer año de uso es menor al 1% (Trussell, 2009). También se ha demostrado su efectividad y seguridad como método de contracepción de emergencia para prevenir el embarazo (Cheng y cols., 2012). De producirse, éstas tienen mayores riesgos de sufrir abortos espontáneos, parto prematuro y corioamnionitis. Se recomienda la extracción del dispositivo cuando se produzcan estos embarazos, para disminuir estos riesgos (Brahmi y cols., 2012). Las principales razones para retirarlos son su expulsión por el propio cuerpo, el dolor experimentado y la presencia de sangrados continuos (Gemzell-Danielsson y cols., 2013). El volumen de sangre parece estar relacionado con el tamaño del dispositivo, ya que GyneFix 330 provoca menos pérdida que el modelo TCu 380A (Reinprayoon y cols., 1995). Otro problema asociado a estos dispositivos en algunas usuarias es la enfermedad inflamatoria pélvica, complicación asociada a la infección que se puede producir en algunas ocasiones en el momento de introducción del DIU (Burkman, 1996). Se ha visto además que la tasa de formación de ovocitos de las portadoras son menores que las tasas de aquellas que no lo utilizan (Ortiz y cols., 1996).

El mecanismo de acción de estos dispositivos está basado en la liberación de iones de cobre y puede ser clasificado dependiendo de cuando lo ejerza, antes o después de la fertilización (World Health Organization Scientific

Group, 1987). Así, se produce un descenso de la motilidad y viabilidad de los espermatozoides por el cérvix, por las trompas de Falopio y por el endometrio; descenso de la velocidad del transporte del ovocito a través de las trompas de Falopio; y el daño o destrucción del ovocito antes de su fecundación. Su posible mecanismo de acción tras la fecundación incluye el descenso de la velocidad del ovocito a través de las trompas de Falopio, el daño o destrucción del cigoto temprano antes de que alcance el útero, y la modificación de la receptividad endometrial a través de una respuesta inflamatoria local (Stanford y Mikolajczyk, 2002; Gemzell-Danielsson y cols., 2013).

#### **2.1.4. Efectos sobre el tejido endometrial**

En la actualidad, no hay datos que sugieran posibles efectos abortivos durante el desarrollo temprano del embrión en el endometrio materno tras la implantación. El cobre produce una alteración del patrón normal de microvellosidades de las células endometriales, las cuales soportan la rigidez de las membranas celulares (El-Badrawi y cols., 1981). Las mujeres que utilizan DIU de cobre presentan una actividad fibrinolítica y plasminógena elevada, lo que conlleva al desarrollo de periodos irregulares (Zhang y cols., 1987). También, se produce un aumento del flujo sanguíneo subendometrial en pacientes con DIU de cobre que experimentan un aumento de dismenorrea y/o menorragia (Jimenez y cols., 2006). Estos efectos secundarios son menos frecuentes en mujeres que ya han dado a luz, y por eso tienen unas menores tasas de expulsión y de retirada de este dispositivo si lo comparamos con aquellas que nunca han tenido hijos (Hubacher, 2007).

Los efectos secundarios del uso de los DIU de cobre son un reflejo de los cambios que se producen a un nivel celular y bioquímico en el endometrio. Al tratarse de un objeto ajeno al organismo, el sistema inmunológico lo reconoce como extraño, por lo que aumenta la producción de células mononucleares, neutrófilos y células plasmáticas (Reinprayoon, 1992). Además, aumentan los niveles de prostaglandinas en el endometrio disminuyendo la contracción de los

músculos uterinos y aumentando la dilatación vascular, por lo que aumentan tanto el volumen como la duración de los sangrados (Ylikorkala, 1994).

Cuando se usan por un periodo de tiempo prolongado, el patrón de distribución de las integrinas en el endometrio cambia, disminuyendo la receptividad endometrial y descendiendo las probabilidades de embarazo (Oruc y cols., 2005). Las nanopartículas de cobre inducen procesos inflamatorios agudos y crónicos, al igual que ocurre con la presencia del DIU de cobre en el endometrio (Patai y cols., 2003). Los procesos inflamatorios sin resolver pueden dar lugar a aberraciones del DNA que pueden llegar a ser mutagénicas (Magaye y cols., 2012). Los DIUs de cobre aumentan los intermediarios reactivos de oxígeno en el endometrio, y como consecuencia, se produce un efecto bactericida (Anjalika y cols., 1999). Aunque se ha relacionado el cobre con el daño al DNA, no hay pruebas de que sea carcinógeno (Magaye y cols., 2012). De hecho, su uso continuo provoca una reducción significativa tanto de la actividad mitótica endometrial como de las concentraciones de receptores de estrógenos, sin afectar los niveles de progesterol o de estradiol (Guleria y cols., 2004).

El cobre es un elemento traza necesario para la vida celular ya que forma parte de enzimas vitales para la respiración celular, para la oxidación del hierro, para la formación de tejido conectivo, para la síntesis y metabolismo de algunos neurotransmisores (Gitlin, 2003). Cuando hay un exceso de este elemento se vuelve tóxico para el organismo al poder participar en la reacción de Fenton y producir especies reactivas de oxígeno (ROS) (Uriu-Adams y Keen, 2005). Los iones de cobre en células epiteliales de endometrio reducen la viabilidad celular, pudiendo ser los causantes del dolor pélvico y sangrados que se producen a veces en el periodo inicial del uso de los DIU de cobre (Wu y cols., 2012). Este elemento causa también toxicidad mitocondrial y reduce los niveles de ATP intracelulares (Filomeni y cols., 2009). Hay dos posibles vías por las que el cobre produce apoptosis: una es por el incremento de Bax que estimula la liberación de citocromo C desde la mitocondria al citoplasma activando la caspasa 9 y esta a

su vez a la caspasa 3; y la otra es mediante la activación del AIF por el aumento de Bax y de ROS en la mitocondria, siendo esta vía independiente de caspasas (Kawakami y cols., 2008). De hecho, el [Cu (bitpy) (dmp)] (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O], un posible fármaco antiproliferativo, induce la apoptosis con una reducción del nivel de proteínas Bcl-2 y una sobreexpresión de las proteínas Bax, marcadores de la apoptosis (Rajalakshmi y cols., 2012).

## 2.2. Muerte celular

### 2.2.1. Tipos de muerte celular

Para que se produzca la homeostasis en los organismos pluricelulares debe existir un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular. La clasificación más clásica y sencilla de la muerte celular distingue tres tipos: de **tipo I** es la muerte celular programada o apoptosis; de **tipo II** caracterizada por la formación de vacuolas autofágicas, se trata de la muerte por autofagia; y el **tipo III**, que es la muerte celular accidental o necrosis (Clarke, 1990).

La necrosis se caracteriza morfológicamente por una vacuolización e inflamación del citoplasma, la rotura de la membrana plasmática, la pérdida de la estructura de los orgánulos y la liberación del contenido celular. Esta descarga del contenido celular activa distintos mecanismos del sistema inmunitario causando inflamación en el tejido circundante. Es interesante el hecho de que la morfología nuclear cambia en las células muertas por necrosis pero no se condensa la cromatina ni se produce fragmentación del DNA, fenómeno característico de la apoptosis celular. Las características que diferencian la necrosis y la apoptosis se encuentran recogidas en la tabla I. Las causas que desencadenan la necrosis son debidas a un gran estrés celular como pueden ser calor, shock osmótico, estrés mecánico, altas concentraciones de elementos tóxicos, etc.



Apoptosis	Necrosis
1.- Contracción celular	1.- Hinchazón celular
2.- Se mantiene la integridad de los orgánulos	2.- Hinchazón y daño de los orgánulos
3.- Niveles de ATP estables	3.- Agotamiento del ATP
4.- Se mantiene la homeostasis de los iones	4.- Pérdida de la homeostasis de los iones
5.- Formación de burbujas en la superficie de la membrana	5.- Ruptura de la membrana plasmática
6.- Condensación y/o fragmentación de la cromatina celular	6.- Lisis nuclear
7.- Requiere la síntesis de proteínas efectoras de la muerte celular	7.- No se produce síntesis proteica
8.- Puede prevenirse a través del bloqueo de la cascada de señales de muerte	8.- Es irreversible
9.- No afecta a las células vecinas	9.- Promueve la muerte de las células vecinas

**Tabla I. Características diferenciales de los tipos de muerte celular por necrosis y apoptosis (Brady y cols., 2012).**

Los receptores de la muerte celular pertenecen a la superfamilia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF, de sus siglas en inglés), que, al recibir señales externas y unirse con sus ligandos, forman agregados que pueden desencadenar una respuesta necrótica o apoptótica dependiendo del tipo celular. Si alguna de las rutas de las caspasas referentes a la apoptosis está bloqueada, la célula puede sufrir necrosis en su lugar.

La necrosis tiene una gran importancia en enfermedades tan relevantes como el cáncer, ya que, a menudo, grandes niveles de necrosis son indicadores de un mal pronóstico (Ficarra y cols., 2006, Ord y cols., 2007). Esto puede deberse al gran crecimiento que experimentan, y a la reacción inflamatoria que se da al liberar el contenido celular. La inflamación provocada puede dañar los tejidos de por sí al causar ciclos de reparación-proliferación en el que están envueltos factores de crecimiento importantes en algunos tipos de cáncer (Vakkila y cols., 2004).

La muerte celular de tipo II, o autofagia, es un mecanismo conservado a lo largo de la evolución para mantener la homeostasis celular. La autofagia como tipo de muerte celular se caracteriza por la exhibición de marcadores autofágicos, la lipidación de la proteína LC3, un aumento en la degradación del sustrato p62 y la formación de los denominados autofagosomas (Fulda, 2015). Los autofagosomas son vesículas de doble membrana que se fusionan con los lisosomas para formar los autofagolisosomas. El contenido fagocitado es degradado por las proteasas lisosomales, y la muerte celular se produce de manera dependiente o independiente de caspasas (Xue, 1999). Además, aquellas células que bajo condiciones de estrés tienen alguna anomalía en la maquinaria apoptótica acaban experimentando un proceso autofágico. En este trabajo nos centraremos en la muerte celular de tipo I, la apoptosis.

### 2.2.2. Apoptosis

La muerte celular programada, o apoptosis, es un proceso biológico fundamental en el desarrollo embrionario, en la homeostasis tisular y en los mecanismos de defensa. Está definida por una serie de características morfológicas que podríamos resumir en la formación de burbujas en la membrana plasmática (proceso conocido como *blebbing*), disminución del volumen celular, condensación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos (Kerr y cols., 1972). Las características bioquímicas que definen a la apoptosis son la activación de las caspasas, la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la activación de enzimas hidrolasas catabólicas (Mariño y cols., 2014).

Existen dos vías de activación de la apoptosis: la vía extrínseca y la vía intrínseca. La vía extrínseca se inicia por señales extracelulares que son recogidas y amplificadas por receptores transmembrana. Se produce una unión de ligandos de muerte como el ligando FAS/CD95 o TNF $\alpha$  a sus receptores de membrana FAS/CD95 o al receptor TNF $\alpha$  1, y se inicia una cascada de

activación de las caspasas que incluye a la caspasa 8, la caspasa 9 y la caspasa 3, dando como resultado la apoptosis (Shakibaei y cols 2005).

La activación de la vía intrínseca se produce por condiciones de estrés celular cómo daño en el DNA, acumulación de especies reactivas de oxígeno, aumento de los niveles de calcio citoplasmático y otros muchos factores. Normalmente se producen a la vez tanto señales pro-apoptóticas cómo anti-apoptóticas, dándose la apoptosis cuando el balance es favorable hacia las señales pro-apoptóticas. Esta apoptosis producida por estrés celular activa a la proteína p53, que promueve la liberación de citocromo c en el citoplasma. Se produce de nuevo una activación en la cascada de las caspasas que resulta en apoptosis (Li y cols., 2014).

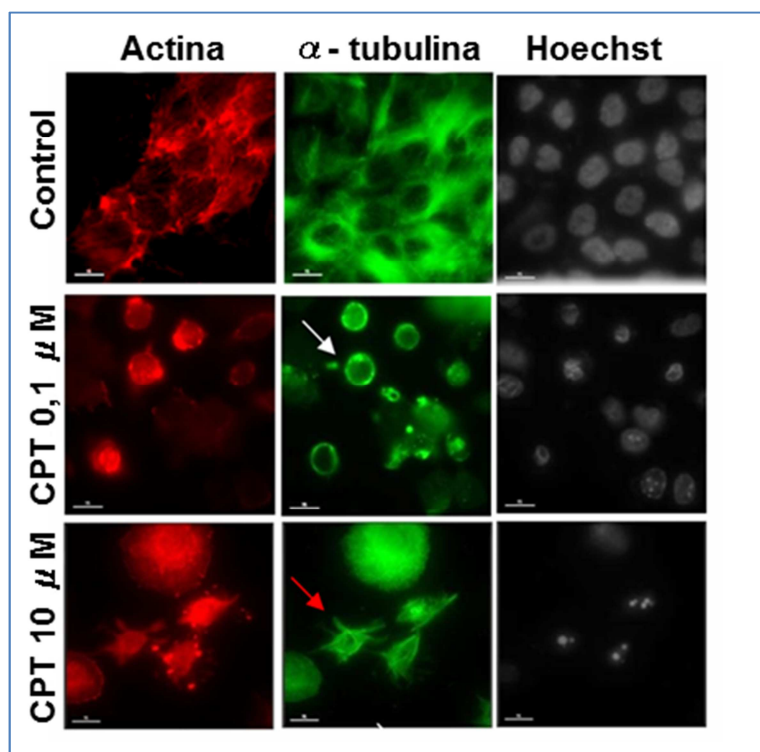
La apoptosis puede ser dividida en tres fases diferentes:

1. **Fase de iniciación:** las señales pro-apoptóticas o extracelulares activan los mecanismos apoptóticos.
2. **Fase de ejecución:** en la que se liberan y degradan proteínas y otros componentes intracelulares.
3. **Fase de eliminación:** los restos celulares son fagocitados a través de cuerpos apoptóticos (Moffitt y cols., 2010).

### **2.2.3. Red de microtúbulos apoptóticos**

Durante la fase de ejecución de la apoptosis el citoesqueleto celular sufre una serie de reorganizaciones que permite los cambios morfológicos de esta fase. Al comienzo de la fase de ejecución el citoesqueleto de actinmiosina tiene un papel relevante en el remodelamiento celular, mientras que los microtúbulos y los filamentos intermedios están despolimerizados. En cambio, al final de la fase de ejecución, los microtúbulos se reorganizan para preservar la membrana plasmática de la acción de las caspasas y para mantener las reacciones de degradación en el interior celular.

Esta estructura de tubulina formada en el córtex celular encargada de preservar la membrana plasmática es conocida como red de microtúbulos apoptóticos (AMN de sus siglas en inglés) (figura 3). Se ha comprobado su existencia tanto en células in vitro como in vivo para descartar que la aparición de esta estructura fuera debido a artefactos de la técnica. Además, se ha comprobado que juega un efecto protector, retrasando el inicio de la necrosis secundaria (Sánchez-Alcázar y cols., 2007).



**Figura 3. Tipos de apoptosis según AMN.**

Línea celular de cáncer de pulmón H460 en la que se observa una muestra viva control, unas células con el AMN redondeado a bajas concentraciones de CPT (0,1μM) y unas células con el AMN irregular a altas concentraciones de CPT (10μM) (Oropesa-Ávila y cols., 2016).

Estudios más recientes han clasificado la apoptosis en dos tipos en función del tipo de reordenamiento del AMN. Una es conocida como la apoptosis lenta o de forma redondeada y se caracteriza por una activación tardía de las caspasas, siendo resistente a la necrosis secundaria; y la otra, es la apoptosis rápida o de forma irregular en las que activan las caspasas de manera temprana, produciendo la necrosis secundaria con gran rapidez. La manera en la que se reorganiza el AMN y, por lo tanto, el tipo de apoptosis que sufre la célula puede tener como desencadenante diferentes respuestas por parte del sistema

inmunológico. La apoptosis lenta o redondeada es un tipo de apoptosis más fisiológica, mientras que la apoptosis rápida o irregular es un tipo de apoptosis más patológica (Oropesa-Ávila y cols., 2016).

## **2.3. El endometrio**

### **2.3.1. Definición**

El endometrio humano es la capa interna de la cavidad uterina. Está muy regulado hormonalmente y experimenta severos cambios periódicos que son la base del ciclo menstrual en humanos y en primates superiores. En el resto de mamíferos se produce un ciclo estral, que es el tiempo transcurrido entre dos ovulaciones. Las principales diferencias en los ciclos estrales es que el endometrio no se desprende, sino que se reabsorbe, y, además, no están regulados hormonalmente (Campbell, 2005).

Los cambios cíclicos producidos en los seres humanos van encaminados a la consecución de un estadio receptivo endometrial, requisito imprescindible para la implantación embrionaria y el desarrollo de la gestación (Simón y cols., 2009). Para que se produzca con éxito la implantación, además, es necesario un diálogo molecular entre el embrión en estado de blastocisto y el endometrio receptivo (Ruan y cols., 2014).

### **2.3.2. Anatomía y fisiología del endometrio**

El endometrio humano es una mucosa compleja formada por dos capas principales: una capa basal o germinal que perdura ciclo tras ciclo y llamada capa *basalis*, y una capa funcional superficial transitoria, conocida como capa *funcionalis*, que es eliminada y regenerada mensualmente (Maruyama y Yoshimura, 2008). Sus componentes tisulares están formados por un epitelio superficial de revestimiento y, por componentes glandulares en el tejido estromal,



que se encuentra densamente irrigado por vasos sanguíneos (figura 4). Además existen otros tipos celulares como células endoteliales o células inmunes residentes.

El epitelio luminal es cilíndrico simple, estando constituido tanto por células ciliadas como no ciliadas, incrementando su número durante la fase proliferativa del ciclo menstrual. Este aumento en la proporción de células no ciliadas y células ciliadas es de 30:1 a 15:1 en esta fase, con un gran descenso después de 20 días hasta 50:1 (Masterton, 1975; Fierncy, 1977). A mitad del ciclo endometrial las uniones oclusivas entre estas células son más numerosas que al final del mismo, sugiriendo una disminución de estas durante la implantación embrionaria (Rogers y Murphy, 1992). Además, el ratio y la distribución de desmosomas también se encuentran disminuidos durante este mismo periodo (Sarani y cols., 1999). Una de las funciones de este epitelio es la defensa frente a patógenos externos, aunque su función principal es permitir la implantación embrionaria. En él, se establece el primer contacto con el blastocisto, y se diferencia considerablemente durante la fase receptiva para facilitar la unión del embrión y que tenga lugar la implantación.

El epitelio glandular durante la fase proliferativa está cubierto de microvellosidades cuyo número va aumentando con el desarrollo del ciclo. Además, las células presentan uniones laterales de membrana, desmosomas y uniones ocluyentes (Singh y Aplin, 2009). Existen numerosos ribosomas y polisomas en el interior celular durante esta fase, encontrándose disminuidos en su parte basal al final del ciclo (Wynn y Harris, 1967). El aparato secretor celular, incluyendo el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático liso, está pobremente desarrollado, sin embargo, al comienzo de la fase secretora empiezan a segregar moléculas complejas que parecen tener una gran importancia para el trofoblasto (Cornillie y cols., 1985). Una característica propia de la fase secretora temprana es la visualización de mitocondrias “gigantes”. Su origen es debido a la fusión y reorganización de mitocondrias normales y pequeñas, que responden a la acción de la progesterona en el DNA (Coaker y cols., 1982).

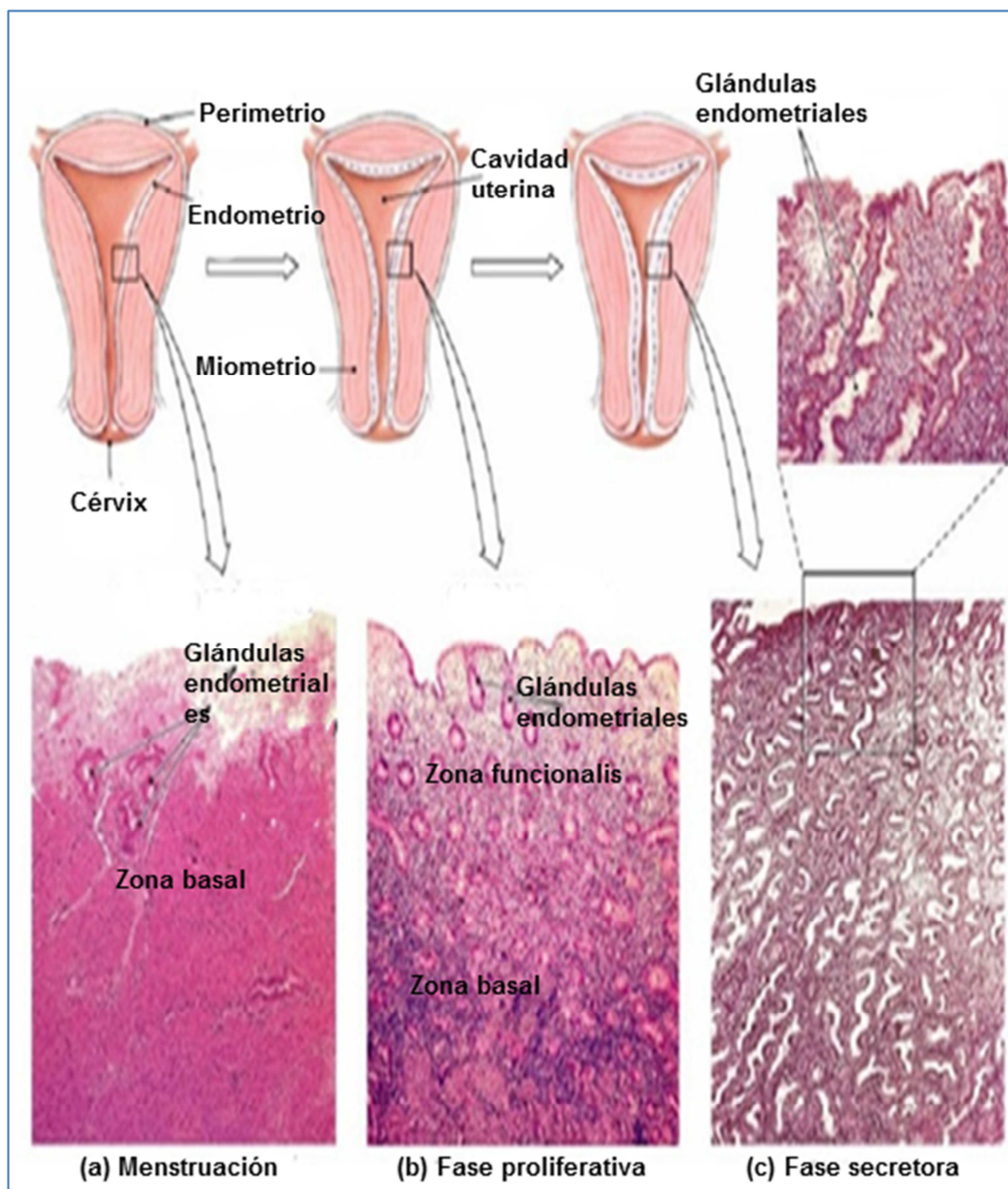


Figura 4. Anatomía del endometrio en las distintas fases del ciclo endometrio.

El estroma endometrial es un tejido conectivo formado por células y una matriz extracelular compleja con componentes fibrilares. Su principal componente celular son las células estromales, de tipo fibroblasto, responsables de la producción de la mayor parte de la matriz extracelular (Wynn, 1989). Estas experimentan cambios morfológicos a lo largo del ciclo menstrual que están correlacionados con su proliferación, diferenciación y maduración (Wienke y

cols., 1968; More y cols., 1974). Las uniones entre las células estromales son de tipo gap (Parmley y cols., 1990), mientras que entre las células epiteliales y estromales existe un mayor contacto entre ellas debido a la mayor complejidad de las proyecciones epiteliales en la lámina densa (Roberts y cols., 1988). Durante la fase secretora debido a la acción de la progesterona, los estrógenos y del adenosin monofosfato cíclico (cAMP), las células estromales se diferencian en células decidualizadas, proceso que dura, al menos, 10 días (de Ziegler y cols., 1998). En humanos la decidualización se produce cada ciclo independientemente de si se produce o no embarazo. Las células decidualizadas segregan hormonas, factores de crecimiento y citoquinas como la prolactina (PRL) (Daly y cols., 1983) o el factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGFBP-1) (Giudice y cols., 1992), siendo estos dos últimos utilizados como marcadores de decidualización. Estos factores segregados favorecen la implantación embrionaria, remodelan la matriz extracelular y protegen del daño oxidativo (Gellersen y cols., 2007; Saleh y cols., 2011).

En cada ciclo menstrual debido al crecimiento y diferenciación celular, así como a los factores secretados por estas células, se produce un nuevo sistema de irrigación sanguínea por angiogénesis y un reordenamiento vascular (Jabbour y cols., 2006). La expresión de factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o la angiopoyetina (ANGPT), están relacionados con la angiogénesis y el remodelamiento sanguíneo en el endometrio, estando regulados por hormonas esteroideas, por células estromales decidualizadas y por células del sistema inmunitario (Smith, 2000; Shibuya, 2006; Tsuzuki y cols., 2013).

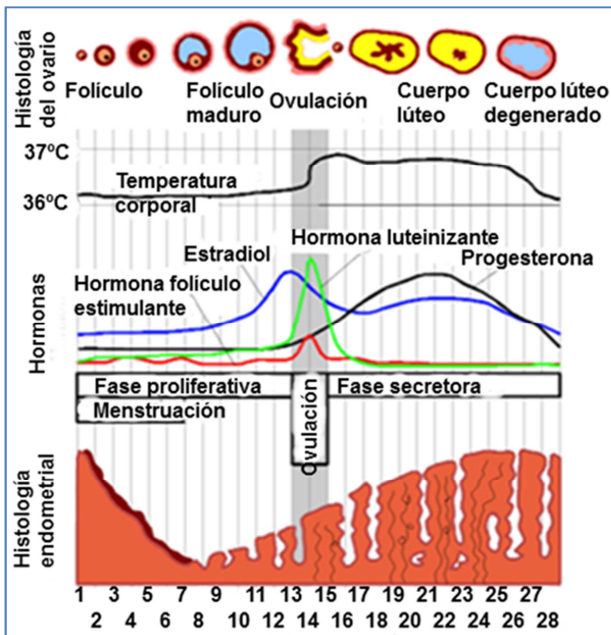
La población de células inmunitarias en el endometrio es muy diversa, encontrándose entre ellas linfocitos T, macrófagos, neutrófilos y mastocitos (Teles y Zenclussen, 2014). Cada tipo celular del sistema inmunitario tiene funciones indispensables para que se produzca una correcta implantación embrionaria y no haya rechazo. Los linfocitos T representan del 40-60% de la población leucocitaria del endometrio, jugando un papel crucial en la

inmunosupresión para posibilitar la tolerancia al feto (Saito y cols., 2007). Los linfocitos granulados, sin embargo, están relacionados con la invasión del trofoblasto y con la secreción del factor de crecimiento transformante (TGF) (Bulmer y cols., 1991). Las funciones de los macrófagos son diversas, contribuyendo a la matriz extracelular, regeneración del tejido y producción de proteasas y citoquinas para la limpieza del endometrio de restos celulares tras la menstruación (Bulmer y Lash, 2015).

### **2.3.3. Ciclo menstrual**

El ciclo menstrual, también conocido como ciclo endometrial, es el periodo que va desde el primer sangrado menstrual hasta el inicio de la menstruación del siguiente ciclo. En ese tiempo, además, se produce la maduración del ovocito, la ovulación y, su llegada al útero fertilizado o no (figura 5). La duración media en humanos es de 28 días, estando la mayoría de ellos entre 25 y 30 días (Boynton y cols., 1967). Casi todas estas variaciones se deben a modificaciones en la duración de la fase proliferativa del ciclo menstrual.

El ciclo menstrual está definido por el ciclo ovárico como respuesta a las hormonas esteroideas. La retroalimentación negativa del ovario sobre la secreción de gonadotropina es muy potente en los primeros años de vida, siendo mínima después de la menopausia (Messinis, 2006).



**Figura 5. Ciclo menstrual en humanos.** Se muestra la histología del ovario, la temperatura corporal, las hormonas involucradas y la histología endometrial. Disponible en <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:MenstrualCycle.png> bajo licencia creative commons cc-by-sa 3.0.

## 2.4. Receptividad endometrial

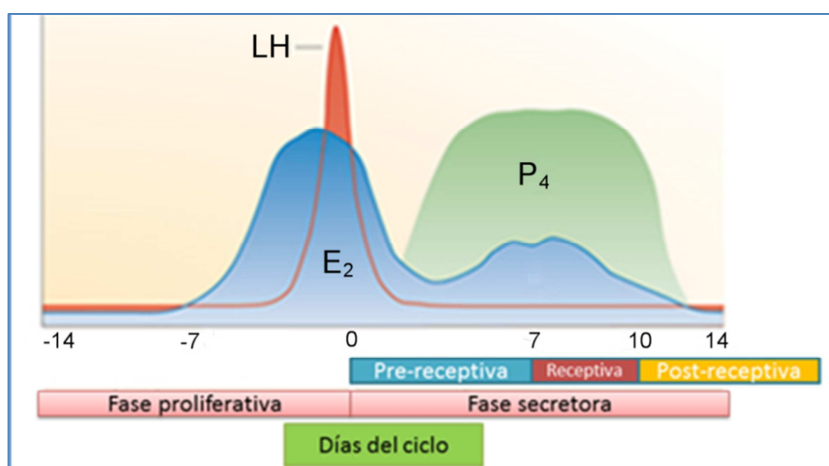
### 2.4.1 Definición

Consta de dos fases: fase proliferativa y fase secretora. La fase proliferativa comienza con la menstruación y termina con la ovulación. La principal característica de este periodo es el desarrollo de los folículos ováricos. La duración de la fase secretora es de 14 días en la mayoría de las mujeres. En esta fase en la que se forma el cuerpo lúteo que segrega progesterona, cuya principal función es preparar al endometrio para que responda a los estrógenos y se pueda producir una correcta implantación del óvulo fecundado.

Se conoce como receptividad endometrial al proceso biológico que permite al revestimiento uterino, el endometrio, alcanzar unas características histológicas, celulares y moleculares óptimas para la implantación del embrión. Para que la implantación embrionaria tenga éxito se necesita un endometrio

receptivo, un embrión funcional en estadio de blastocisto y un diálogo molecular entre los tejidos maternos y embrionarios (Simón y cols., 2000).

El endometrio humano experimenta cambios periódicos durante el ciclo menstrual en respuesta a hormonas esteroideas. El fin último de todos estos cambios es alcanzar la receptividad endometrial y para facilitar la implantación embrionaria. El periodo en el que el endometrio es receptivo se denomina ventana de implantación (*window of implantation*, WOI), y ocurre, en ciclos naturales, entre los días 19 y 21 del ciclo menstrual, siete días después del pico endógeno de LH (LH+7) que desencadena la ovulación (figura 6) ( Navot y cols., 1991; Prapas y cols., 1998; Riesewijk y cols., 2003). En cualquier otro periodo del ciclo menstrual el endometrio es no receptivo y la implantación embrionaria no puede ocurrir con éxito (Garrido-Gómez y cols., 2013). Durante la WOI el epitelio endometrial adquiere un estado dependiente de hormonas esteroideas del ovario que permite la adhesión del blastocisto (Tamaya y cols., 1986).



**Figura 6. Ventana de implantación.** Diferentes estadios de receptividad durante el ciclo menstrual en consonancia con los niveles de las hormonas LH, E2 y P4.

En ciclos naturales el endometrio es controlado por las hormonas esteroideas ováricas, estradiol y progesterona mediante su unión a receptores de alta afinidad, iniciando una cascada de señales que altera la expresión génica endometrial (O'Malley y Tsai, 1992). De esta manera se dan una serie de

cambios morfológicos, estructurales y bioquímicos para preparar al endometrio para la implantación embrionaria.

### **2.4.2. Marcadores de receptividad endometrial**

Los marcadores de receptividad endometrial son aquellos parámetros que nos permiten identificar y distinguir un endometrio receptivo de uno no receptivo. Permiten clasificar el endometrio en las distintas fases del ciclo endometrial y diferenciar si el endometrio se encuentra apto o no para la implantación embrionaria (Fox y cols., 2016).

Los marcadores de receptividad endometrial pueden ser clasificados a partir del método de obtención utilizado. Existen marcadores histológicos, moleculares, microRNAs (miRNA) y marcadores “ómicos” (Aghajanova y cols., 2008; Galliano y Pellicer, 2014).

#### **2.4.2.1. Marcadores histológicos**

Los primeros sistemas de evaluación endometrial fueron desarrollados en los años 50 por Noyes y colaboradores. Estos marcadores han sido utilizados rutinariamente durante más de 50 años en las clínicas de reproducción asistida (Noyes, 1950; 1975). Describen diferentes características histológicas a lo largo del ciclo menstrual, permitiendo datar el endometrio durante la fase lútea. Estos criterios histológicos están basados en el grado de mitosis glandular, la pseudoestratificación del núcleo, las vacuolas basales, la secreción celular, el edema estromal, la reacción pseudodecidual, las mitosis del compartimento estromal y la infiltración leucocitaria (Noyes, 1950; 1975).

A pesar de haber sido utilizados ampliamente en la práctica clínica, al tratarse de criterios subjetivos para cada especialista, el valor predictivo ha resultado ser muy pobre. En ensayos aleatorios controlados se ha comprobado que no pueden predecir el estatus de receptividad endometrial con exactitud

(Coutifaris y cols., 2004, Murray y cols., 2004). El Comité de Práctica de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (*American Society for Reproductive Medicine*, ASRM) desaconseja el uso de biopsias endometriales para el dataje endometrial, basándose en los resultados de ensayos clínicos aleatorios, prospectivos y ciegos, ya que no permite distinguir entre mujeres fértiles e infértiles y, además, es ineficaz para el diagnóstico o tratamiento de la deficiencia de la fase lútea (*Practice Committee of the ASRM*, 2015).

Como marcadores morfológicos de receptividad endometrial han sido propuestos, además, la presencia de protuberancias globulares en la superficie de la membrana apical de células epiteliales endometriales, conocidas como pinópodos o uterodomas (Martel y cols., 1981, Nikas y cols., 1995). Existe cierta controversia sobre su relevancia como marcador para datar el tejido endometrial y para su uso clínico (Ordi y cols., 2003, Quinn y cols., 2007).

#### **2.4.2.2. Marcadores moleculares**

Debido a la falta de precisión del dataje endometrial mediante marcadores histológicos, en la década de los 90 y principios del siglo XXI, se comenzó a realizar una búsqueda exhaustiva de marcadores moleculares que permitieran conocer el estatus de receptividad endometrial. Algunos de estos marcadores moleculares han sido propuestos por su relevancia en la receptividad endometrial (Giudice, 1999) como interleuquinas (Tabibzadeh y cols., 1995, Arici y cols., 1998), factores de crecimiento (Yoo y cols., 1997, Jones y cols., 2002, Dominguez y cols., 2003), mucinas (Hey y cols., 1994), integrinas (Lessey y cols., 1992, Lessey y cols., 1995), y otros.

El endometrio humano es un sistema muy complejo para poder ser descrito con precisión por la presencia o ausencia de una sola molécula. Debido a la ineficacia de reflejar la biología celular endometrial con un sola molécula, el uso de paneles de marcadores ha ido incrementándose en los últimos años (Taube y cols., 2009).



### **2.4.2.3. MicroRNA**

Los miRNA son pequeñas moléculas de RNA (de 21 a 25 nucleótidos) no codificantes descubiertas en 1993 (Lee y cols., 1993). En la actualidad han sido descritos más de 2.000 miRNAs diferentes en el ser humano que regulan alrededor de un tercio del genoma (Hammond, 2015). Han sido utilizados en investigación en la búsqueda de nuevos marcadores de diversas enfermedades como cáncer de pulmón (Zhu y cols., 2016), alzhéimer (Lugli y cols., 2015), diabetes (Al-Kafaji y cols., 2015) o enfermedades del corazón (Schulte y cols., 2015).

En los últimos años se ha comenzado a investigar su papel en la receptividad endometrial tanto en ciclos naturales como ciclos estimulados, encontrándose distintos tipos de perfiles de expresión entre endometrios receptivos y no receptivos (Sha y cols., 2011, Altmae y cols., 2013) o en las distintas fases del ciclo endometrial (Kresowik y cols., 2014). La búsqueda de marcadores de miRNAs también se ha utilizado en situaciones patológicas de la reproducción como en pacientes con endometriosis (Ohlsson Teague y cols., 2009) o con fallo de implantación (Revel y cols., 2011).

### **2.4.2.4. Marcadores “ómicos”**

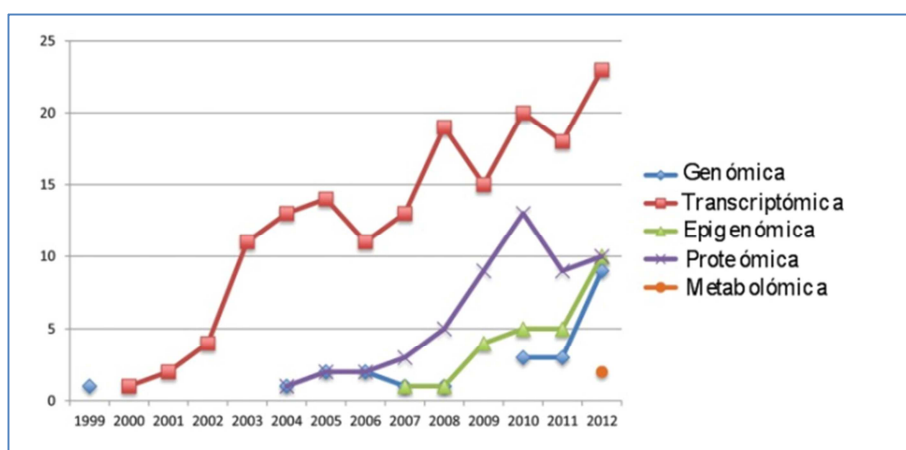
La finalización del Proyecto Genoma Humano en el año 2003 (Lander y cols., 2001; Collins y cols., 2003) desembocó en un gran avance tecnológico, lo que permitió el nacimiento de las denominadas ciencias “ómicas”. En la última década se ha producido un incremento significativo del número de estudios “ómicos” en el endometrio (figura 7).

Las ramas de la ciencia de las “ómicas” más relevantes son:

- **Genómica:** estudia los genomas y los genes que contienen. En medicina reproductiva se han realizado numerosos estudios de asociación del genoma completo para asociar determinados polimorfismos de nucleótido único con la expresión génica (Holdsworth-Carson y cols., 2016).

- **Transcriptómica o Genómica Funcional:** el análisis de la expresión génica global. Es la “ómica” más empleada en esta área, por ejemplo en estudios de búsqueda de marcadores de receptividad endometrial a través de secuenciación masiva NGS (Hu y cols., 2014).

- **Metabolómica o Metabonomía:** indaga en estudio, a larga escala, de los metabolitos ante una condición fisiológica o patológica concreta. La lipidómica, rama de la metabolómica referente a lípidos, es, en el endometrio, un método no invasivo para el estudio de los lípidos en el fluido endometrial (Achache y cols., 2010).



**Figura 7. Publicaciones “ómicas” sobre estudios en el endometrio humano.** En el eje Y se muestra el número de publicaciones y en el eje X el año de publicación. Se muestran en total 269 artículos: 23 de genómica, 164 de transcriptómica, 26 de epigenómica, 54 de proteómica y 2 de metabolómica. (Altmae, y cols., 2014).

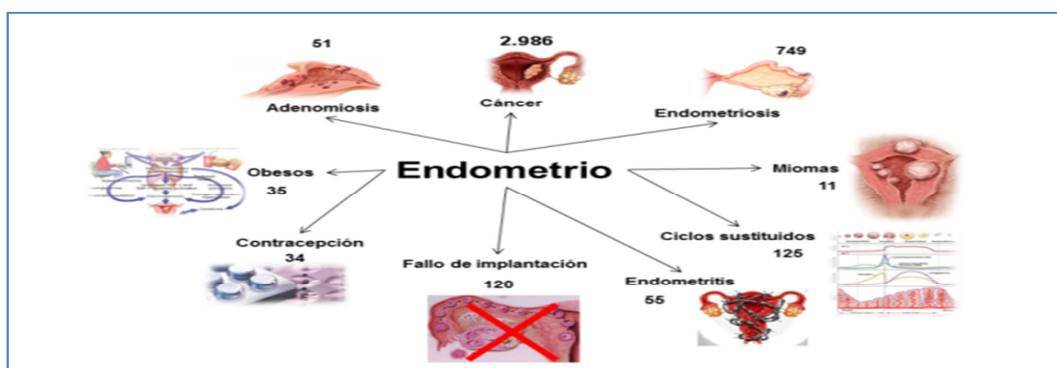
- **Proteómica:** estudio de la colección de proteínas. Como ejemplo, se ha establecido el perfil proteico en mujeres obesas y con sobrepeso que tengan fallo de implantación, donde se ha encontrado un patrón proteico endometrial alterado en estas pacientes (Metwally y cols., 2014)

- **Bioinformática:** ciencia no agraciada con el sufijo “ómico” que permite, por medio de nuevos desarrollos matemáticos, analizar los datos generados en el resto de las “ómicas”. Sin ella, la interpretación de los resultados conllevaría unos gastos de tiempo y personal inasumibles.

## 2.5. Técnicas utilizadas en transcriptómica

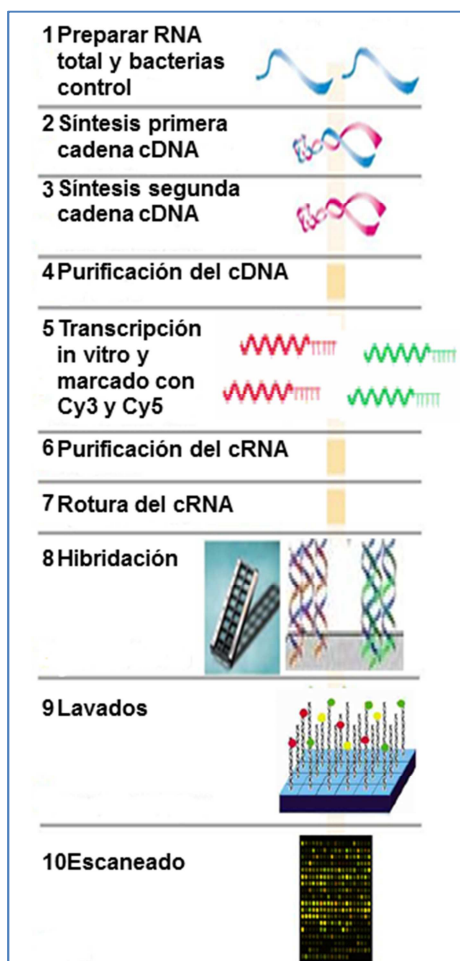
### 2.5.1. Microarrays de expresión génica

La tecnología de microarrays fue descrita por primera vez en 1995 (Schena y cols., 1995), utilizándose ampliamente en numerosas investigaciones, especialmente en reproducción y endometrio (figura 8). Su uso fue aumentando desde sus inicios hasta el año 2015, en el que comienza su declive debido al desarrollo de nuevas técnicas de análisis de expresión génica más precisas, rápidas y económicas como la NGS. Su desarrollo ha permitido medir la expresión de miles de genes a la vez en una situación concreta proporcionándonos el acceso al conocimiento del esquema global de lo que ocurre a nivel génico en un momento determinado.



**Figura 8. Publicaciones de análisis de expresión génica endometrial.** Los términos relacionados con expresión génica en el endometrio que aparecen son: cáncer, endometriosis, miomas, ciclos estimulados, endometritis, fallos de implantación, contracepción, obesos y adenomiosis. De las 5.266 publicaciones de expresión génica en el endometrio, 361 fueron llevadas a cabo con microarrays, un 7% del total.

Esta tecnología está basada en la complementariedad de los ácidos nucleicos y en la capacidad de las hebras de DNA en hibridar unas con otras sobre una matriz de vidrio de silicona o de nylon en las que se imprimen unas



**Figura 9. Microarray de expresión génica.** Workflow en los experimentos con microarrays, en los que se extrae el mRNA, se realiza una transcripción inversa, se marcan con fluoróforos, se hibridan con las sondas y se escanea obteniéndose una imagen que será analizada con un software especializado.

sondas de oligonucleótidos de secuencia conocida. Las sondas son específicas para un solo gen, pero cada gen puede tener múltiples sondas que hibridan con él. El proceso experimental consiste en la obtención del RNA total de las muestras de las que queremos conocer su expresión génica, y a través de una retrotranscripción del RNA mensajero (RNAm), obtiene un DNA complementario (cDNA). Este cDNA contiene, además, la secuencia para la RNA polimerasa T7 por lo que puede ser transcrito in vitro una vez que se genera una segunda cadena de DNA con oligonucleótidos aleatorios. Así, en el siguiente paso se realiza una transcripción

in vitro con la RNA polimerasa T7 y se genera un RNA complementario (RNAc) que además está marcado con fluoróforos, usualmente Cy3 y Cy5 (cianinas) o con Alexa, para que, posteriormente, emitan luz tras excitarlas con una luz de una longitud de onda adecuada. Una vez marcados se aplican sobre el microarray donde hibridan con su sonda complementaria quedándose fijados allí. Tras un tiempo necesario para que hibriden con sus sondas, se realizan una serie de lavados para eliminar el material sobrante que no ha hibridado con ninguna sonda o que ha hibridado de forma inespecífica. El microarray es leído con un escáner láser del cual se obtienen dos imágenes, una para cada

fluoróforo. Estas imágenes son analizadas con softwares especializados que reconocen cada punto o *spot* donde hay sondas con cDNA hibridado y cuantifican la fluorescencia emitida. Los controles son marcados de un color y los tratamientos de otro color (figura 9). Tras un análisis estadístico se obtienen los resultados de expresión para miles de genes en un solo experimento. Existen otros protocolos alternativos, como el marcaje de un solo color, y que dependen de la casa comercial en cuestión. El protocolo aquí descrito es el de uso más frecuente. Esta tecnología ha sido ampliamente utilizada para el estudio del endometrio humano (figura 8), empleándose en estudios de expresión génica global en todas las fases del ciclo menstrual (Ponnampalam y cols., 2004), en ciclos naturales desde estadios pre-receptivos (LH+1/5) a estadios receptivos (LH+7/9) (Carson y cols., 2002, Kao y cols., 2002, Borthwick y cols., 2003, Riesewijk y cols., 2003, Mirkin y cols., 2005, Talbi y cols., 2006, Haouzi y cols., 2009), perfiles de expresión génica durante la WOI en ciclos naturales, estimulados o sustituidos, con agonistas y diferentes dosis de antagonistas (Mirkin y cols., 2004, Horcajadas y cols., 2005, Simón y cols., 2005, Horcajadas y cols., 2008a, Liu y cols., 2008, Haouzi y cols., 2009), en el endometrio refractario por la presencia de un dispositivo intrauterino (DIU) inerte (Horcajadas y cols., 2006), en pacientes con fallo de implantación (Koler y cols., 2009, Koot y cols., 2016), en presencia de miomas (Horcajadas y cols., 2008b), y en otros estudios (Gómez y cols., 2015).

### **2.5.2. Secuenciación masiva (NGS)**

Se ha utilizado la NGS en transcriptómica para revelar la presencia de todos los RNAm en un momento determinado y su cuantificación. Esta técnica es conocida como secuenciación del RNA o RNA-Seq.

El primer paso es extraer el RNA total del tejido de elección y utilizarlo como molde para sintetizar cDNA a través de la retrotranscripción del RNAm. Estas librerías de cDNA son utilizadas para la NGS y el análisis de los resultados se realiza a través de métodos bioinformáticos.

La principal ventaja del RNA-seq es su habilidad para estudiar diferencias de expresión génica y de los polimorfismos de nucleótido único (SNPs de sus siglas en inglés) contenidos en las secuencias analizadas. Comparando los grupos control y de tratamiento se obtienen un conjunto de genes que están sobre-expresados o reprimidos. Una de las grandes ventajas es poder analizar RNAm que no se encuentran en los microarrays o la capacidad de distinguir bajos números de copias.

Hasta la fecha, son pocos los trabajos que han utilizado esta tecnología para el estudio del endometrio, aunque es de esperar que su uso aumente en los próximos años. Así, ha sido utilizada para identificar los miRNAs relacionados con receptividad endometrial tanto en ciclos naturales como en ciclos estimulados utilizando para ello biopsias endometriales o del *villus* (Sha y cols., 2011, Wang y cols., 2016), para analizar los miRNAs contenidos en los exosomas del fluido endometrial conociendo de esta manera el ambiente en el que se produce el diálogo molecular entre el embrión y el endometrio (Ng y cols., 2013) o en estudios más complejos en los que se investiga y cuantifica los miRNAs presentes a lo largo de todo el tracto reproductivo femenino en condiciones fisiológicas normales y patológicas (Creighton y cols., 2010).

### **2.5.3. PCR cuantitativa en microfluidos**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés) fue desarrollada a principios de los años 80 por Kary Mullis. Esta técnica permite obtener millones de copias de fragmentos específicos de DNA en unas pocas horas. Debido a que no se trataba de una técnica cuantificable, se realizaron una serie de modificaciones para el desarrollo de lo que se conoce como PCR cuantitativa o PCR a tiempo real (qRT-PCR de sus siglas en inglés).

Con la PCR cuantitativa se detecta a tiempo real la amplificación del cDNA de interés. Primero se aísla el RNA total de las muestras de interés, y se

realiza una transcripción reversa del RNAm para obtener cDNA. Para llevar a cabo la reacción se unen unas sondas (oligonucleótidos) complementarias al cDNA y la polimerasa va añadiendo nucleótidos a la cadena. Se pueden utilizar dos tipos de moléculas para la emisión y cuantificación de la fluorescencia, estas son las sondas *Taq Man* y el fluoróforo *SYBR Green*. Nos centraremos en este último por ser el que se ha utilizado en este proyecto. El *SYBR Green* es un fluoróforo que se une de manera inespecífica a cadenas dobles de DNA, cuantas más cadenas dobles de DNA, más cantidad de *SYBR Green* se unirá y la cantidad de fluorescencia que se emitirá será mayor de forma proporcional. Al unirse de manera inespecífica se pueden detectar productos inespecíficos y dímeros de oligonucleótidos. Para solucionar esto hay que realizar un diseño muy cuidadoso de los oligonucleótidos y optimizar las reacciones de PCR. Además, al finalizar los ciclos se realiza una curva de desnaturalización o disociación para comprobar que solamente se ha unido a un fragmento. Al ser una PCR cuantitativa por ciclos, la cantidad de fluorescencia emitida en cada ciclo será mayor siendo proporcional al número de moléculas de RNAm iniciales.

La cuantificación que se realiza es relativa, ya que se compara el nivel de expresión de un gen de interés en diferentes situaciones después de normalizar los datos con uno o más genes constitutivos que no varían su expresión en las condiciones experimentales. Al utilizar estos genes constitutivos podemos saber si las diferencias en la cantidad de fluorescencia son debidas a cambios en la expresión génica o a que se partió de una cantidad de RNAm inicial distinta.

El sistema de PCR cuantitativa en microfluidos combina la tecnología de los microarrays con la técnica PCR a tiempo real (figura 10). Antes de realizar las reacciones de PCR cuantitativa, se realiza una amplificación selectiva de nuestros genes de interés para que haya una gran cantidad inicial de cDNA y se alcance en unos pocos ciclos el umbral de fluorescencia. El soporte físico donde se depositan y combina las muestras y oligonucleótidos se denomina arrays dinámicos IFC, y su formato es de 48x48 o de 96x96 (48 muestras y 48 pares de oligonucleótidos, o 96 muestras y 96 pares de oligonucleótidos). En un solo

experimento se realizan 2.304 ó 9.216 reacciones de PCR a tiempo real por array, por lo que el gasto de reactivos y de tiempo se reduce de una manera considerable.



Figura 10. Equipo de PCR a tiempo real en microfluidos Biomark HD y los arrays dinámicos IFC.

Esta herramienta ha sido utilizada en diversos campos de investigación como biología del desarrollo (Fan y cols., 2010), en la detección de patógenos contaminantes de agua y comida (Ishii y cols., 2013), para evaluar el impacto de diversos factores en el tejido adiposo (Viguerie y cols., 2012). Sin embargo, en medicina reproductiva se ha empleado solamente para estudiar el papel de regulación génica del receptor de estrógenos alpha (Abot y cols., 2013), por lo que tiene un enorme potencial todavía por desarrollar en este campo de estudio.

#### **2.5.4. Gene Ontology (GO)**

El Gene Ontology (GO) es una iniciativa bioinformática para dotar de un vocabulario a los genes y los productos de estos. Utiliza un lenguaje adaptado para que los datos puedan ser leídos por los ordenadores, y hacerlo de una manera homogénea para todas las especies.



La ontología es una rama de la metafísica que estudia lo que hay, por lo que las ontologías se tratan de representaciones de hechos o relaciones detectables. La terminología empleada en biología respecto a los genes y sus productos no es universal, y puede ser específica de una especie, área de estudio o incluso de un grupo de investigación en particular. Esto, crea dificultad a la hora de comunicar los resultados obtenidos en una investigación científica. El proyecto de GO ofrece una ontología de términos definidos que representan a los genes y sus productos. Esta ontología se encarga de tres ámbitos:

- **Componentes celulares**, qué parte del interior celular o extracelular.
- **Funciones moleculares**, cuáles son las actividades principales del producto génico a nivel molecular.
- **Procesos biológicos**, serie de eventos biológicos con un inicio o fin bien definido integrado en el funcionamiento de células, tejidos, órganos u organismos.

Cada término de GO posee un identificador alfanumérico, un nombre del término, una definición en la que se cita a las fuentes y un *namespace* para indicar a qué dominio pertenece. Se estructura como una gráfica acíclica en la que cada término establece relaciones con otros términos del mismo dominio o de dominios distintos. El vocabulario que emplea GO es neutral a las especies, e incluye términos aplicables tanto a procariotas como eucariotas así como a organismos pluricelulares o unicelulares.

En GO se producen continuamente correcciones y alteraciones por parte de miembros de investigación o de las comunidades de anotación involucradas en este proyecto. Se accede online a través del buscador AmiGO (anexo VI), y permite la descarga de mapas o de los términos encontrado para otros sistemas de clasificación.

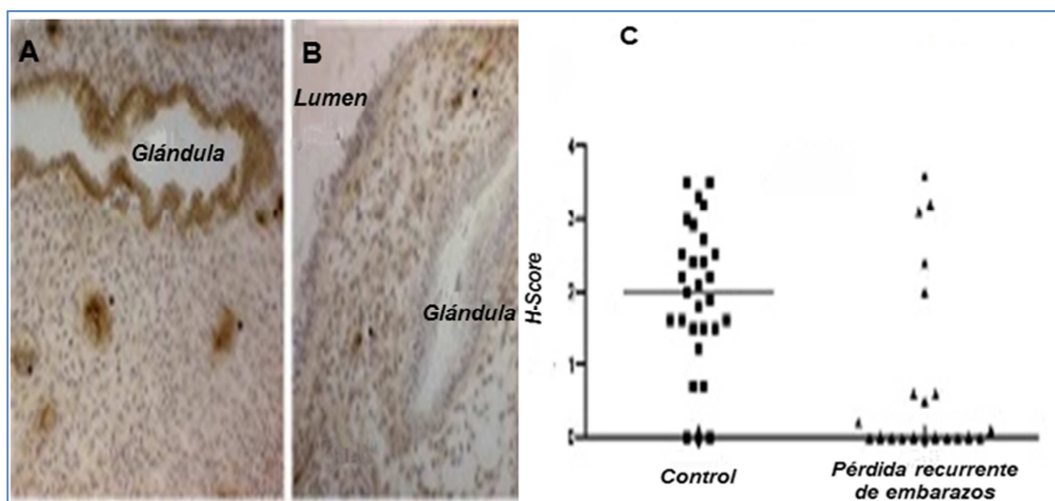
## 2.6. Test de receptividad endometrial actuales

Hasta ahora, la falta de métodos útiles de evaluación endometrial en clínica ha hecho que fuera raramente evaluado en la pareja infértil o antes de un ciclo de reproducción asistida. Sin embargo, en las últimas dos décadas se han desarrollado diversos tests de evaluación del estatus endometrial. Actualmente, hay tres pruebas que evalúan la receptividad endometrial: ***E-Tegrity*** que evalúa los patrones de expresión de la  $\beta$ -3 integrina (Lessey y cols., 1995; 2000), **endometrial function test (EFT)** que utiliza dos marcadores, la ciclina glandular e y el p27 (Dubowy y cols., 2003), y el **array de receptividad endometrial (ERA)** que lleva a cabo un análisis de la expresión de 238 genes por medio de un microarray a la carta de expresión génica (Díaz-Gimeno y cols., 2011).

### 2.6.1. E-Tegrity

En mujeres con infertilidad de origen desconocido el patrón de expresión detectado por inmunofluorescencia de la proteína  $\beta$ -3 integrina está alterado. Esta proteína está relacionada con la implantación embrionaria, produciéndose una mejora en su estabilidad y aumentando las tasas de implantación (Kang y cols., 2014; Schmitz y cols., 2014).

Los autores de *E-Tegrity* descubrieron que la presencia de la  $\beta$ -3 integrina se correlacionaba con la WOI (figura 11) (Lessey y cols., 1995). Durante esta fase si las mujeres son fértiles la proteína está presente, mientras que la ausencia de esta revela infertilidad de origen desconocido, endometriosis o hidrosalpinx (Lessey y cols., 1996; Meyer y cols., 1997). Sin embargo otros estudios independientes que han intentado replicar estos resultados no han encontrado patrones diferentes de expresión entre mujeres fértiles e infértiles (Boroujerdnia y Nikbakht, 2008; Casals y cols., 2008) o en pacientes con endometriosis (Casals y cols., 2012), por lo que su efectividad ha sido puesta en entredicho.

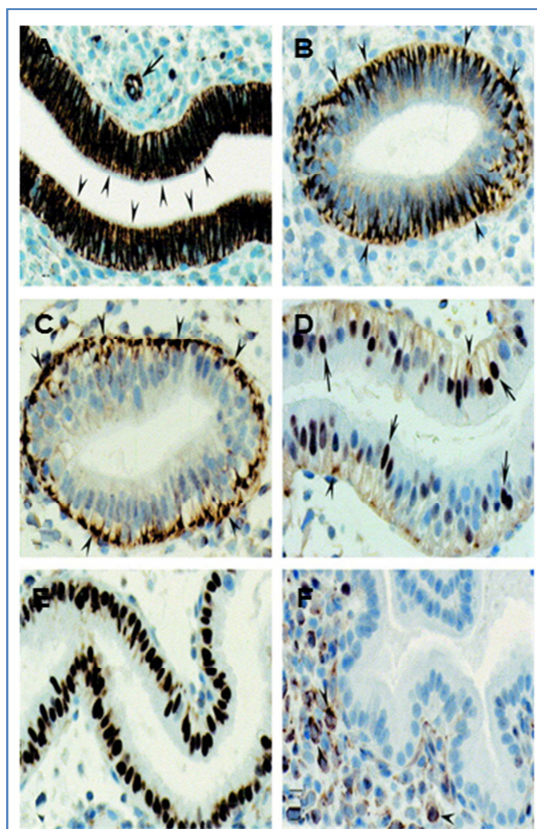


**Figura 11. La expresión de la proteína  $\beta$ -3 integrina refleja defectos en la receptividad endometrial en mujeres con pérdida recurrente de embarazos. A)** Representación inmunohistoquímica de la expresión de la proteína  $\beta$ -3 integrina durante la ventana de implantación en mujeres fértiles **B)** y en mujeres con pérdida recurrente de embarazos. Los asteriscos (\*) representan los vasos sanguíneos endometriales, que son un control positivo interno, con magnificación del 200x **C)** Test T de Student (Lessey y cols., 2014).

## 2.6.2. Endometrial Function Test (EFT)

Este test es el resultado de estudios previos endometriales de marcadores de receptividad potenciales como la ciclina E y p27. La ciclina E actúa en la fase G1 del ciclo celular, ya que es necesaria para la transición G1/S, mientras niveles elevados de la proteína p27 paran el ciclo celular en G1, actuando por tanto como un inhibidor. Se produce una regulación positiva por estrógenos de la ciclina E, mientras que esta regulación positiva en el caso de la proteína p27 es causada por la progesterona (Dubowy y cols., 2003).

El EFT evalúa mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-ciclina E las biopsias endometriales (figura 12). Los patrones de expresión normales están asociados con buena implantación embrionaria, mientras que patrones anómalos están asociados a fallos de implantación embrionaria (Kliman y cols., 2006).



**Figura 12. Inmunohistoquímica de la ciclina E utilizada en el Endometrial Function Test (EFT) a lo largo del ciclo menstrual.** **A)** Expresión de la ciclina E en el citoplasma de glándulas proliferativas tempranas. **B)** Al comienzo del día 16 del ciclo la ciclina E está más presente en la zona basal de las células glandulares con una tinción muy tenue en la zona apical y lateral. **C)** En el transcurso del día 16 al 17 la ciclina E se encuentran exclusivamente en la zona basal. **D)** Entre los días 17 y 18 hay una pérdida progresiva de la tinción de la ciclina E en el citoplasma con un aumento de la tinción en el núcleo. **E)** En el día 19 se produce la mayor expresión glandular en el núcleo. **F)** Después del día 19 hay un rápido descenso de la reacción de la ciclina E. En esta glándula del día 25 sólo hay trazas de ciclina E en el núcleo. (A-F: magnificación del 400x) (Dubowy y cols., 2003).

### 2.6.3. Endometrial Receptivity Array (ERA)

Se trata de un método de dataje endometrial que utiliza la transcriptómica del endometrio a través de microarrays de expresión génica. El microarray de receptividad endometrial (*Endometrial Receptivity Array*, ERA) puede ser utilizado tanto en ciclos naturales como sustituidos, y para definir la WOI y los distintos perfiles de expresión génica posibles basados en 238 genes (Díaz-Gimeno y cols., 2011). A través de un predictor informático se analiza la expresión génica de estos 238 genes y clasifica las muestras en receptivas o no receptivas, siendo a su vez las muestras no receptivas clasificadas en pre-receptivas y post-receptivas. De esta manera, conociendo el estatus de receptividad endometrial se puede personalizar el tratamiento, conociendo el día exacto en el que se debería realizar la transferencia embrionaria en lo que se ha

dado a llamar pET (*personalized embryo transfer*) (Ruiz-Alonso y cols., 2013). Se ha empleado también para el estudio en pacientes con endometriosis, sin que la firma transcriptómica variara de los controles, de hecho, ninguno de los 238 genes se encontraba significativamente sobre o infra expresado (García-Velasco y cols., 2015).

## 2.7. Contexto científico actual

El dispositivo intrauterino (DIU) es el método anticonceptivo reversible más utilizado en el mundo. En los países en desarrollo es utilizado por un 14,5% de mujeres en edad reproductiva, mientras que en los países desarrollados solo por un 7,6% (d'Arcangues y cols., 2007). Uno de los tipos más sencillos está formado por plástico y cobre para evitar que el espermatozoide llegue hasta el óvulo. Algunas mujeres presentan sangrados abundantes que podrían ser una de las consecuencias del uso de este metal en el DIU, por lo que se podría buscar una vez estudiadas las diversas rutas metabólicas en las que influye el cobre, moléculas farmacológicas para evitar estos sangrados. No existen estudios sobre los efectos apoptóticos del cobre sobre las células estromales de endometrio humano y de cómo esto influye modificando la receptividad endometrial para evitar la posible implantación del embrión. Tampoco se ha comprobado cómo influye la liberación de este metal sobre la expresión de los genes de receptividad endometrial, con lo que se pueden descubrir nuevas vías por las que falla la correcta implantación del embrión.

Hoy en día alrededor del 15% de las parejas necesitan ayuda médica para poder concebir un hijo (*World Health Organization*, 2010). Existen muchos factores que influyen en las altas tasas de infertilidad en las parejas; una de las principales causas conocidas es la edad materna. Por otro lado hay factores masculinos y de origen desconocido que causan abortos recurrentes y fallos en la implantación (ESHRE, 2014). El éxito de la implantación depende de dos factores importantes: de la calidad del embrión y de la receptividad endometrial. Además, hay un diálogo molecular entre el embrión y las células endometriales

que es esencial para una implantación exitosa. Esta interacción es fundamental para la adhesión del blastocisto al endometrio humano y su subsecuente invasión (Giudice, 1999). El deterioro o mal funcionamiento de la receptividad endometrial es la principal causa de fallo en el proceso de implantación del trofoblasto y de su invasión, y es considerado ahora uno de los principales factores limitantes para conseguir un embarazo, una vez que la calidad embrionaria ha sido certificada (Boivin y cols., 2007).

Es conocido que el endometrio tiene un perfil de expresión génica determinado durante la WOI y que su firma transcriptómica puede ser usada para la evaluación de la función endometrial y su adaptación a la WOI. El enfoque de los estudios de receptividad endometrial ha generado una gran lista de genes con funciones conocidas y desconocidas en este proceso crítico.

A partir de la lista de genes empleada en el estudio de los efectos del cobre hemos desarrollado un nuevo sistema de evaluación endometrial humana basado en genes relacionados con la inmunidad y la receptividad. Esta nueva herramienta ha sido diseñada con una nueva lista de genes extraída de los estudios publicados en los últimos 12 años y se ha empleado para el estudio de los efectos del cobre en la receptividad endometrial, y posteriormente para el dataje endometrial en clínicas de reproducción asistida a través de un nuevo algoritmo para analizar la expresión génica. Esta nueva herramienta molecular ha permitido desarrollar un nuevo sistema de diagnóstico con la plataforma *BioMark* de *Fluidigm*, se trata de un método rentable para el análisis de expresión génica.

El sistema *Biomark* de *Fluidigm* es capaz de automatizar miles de reacciones de PCR individuales, con una gran disminución en el número de pasos de pipeteo y de la cantidad de muestra y de reactivo utilizado. Las características de esta plataforma son mucho más sensibles que los microarrays de expresión génica y mucho menos costosos que el uso de la NGS, además produce más resultados de una manera más rápida (9.216 puntos de datos en

tan solo 4h con un ciclo y un técnico de laboratorio), con una mayor sensibilidad y un mayor rango dinámico de microarrays.

En este estudio proponemos una nueva herramienta diagnóstica de receptividad endometrial, con una mayor exactitud que las pruebas predecesoras. Con respecto a la precisión, se ha reducido el número de genes específicos que realmente están relacionados con problemas endometriales a menos de 50.





### 3. HIPÓTESIS



Confirmar si el cobre, utilizado en concentraciones similares a las liberadas por los DIUs de cobre, ejerce algún efecto sobre la apoptosis de las células endometriales estromales decidualizadas, y comprobar cómo su presencia altera el perfil de expresión génica de genes relevantes en el desarrollo de la receptividad endometrial.



## 4. OBJETIVOS



El objetivo principal de este proyecto es estudiar los efectos del cobre en la apoptosis celular de células endometriales y en la receptividad endometrial. Un segundo objetivo es desarrollar una nueva herramienta diagnóstica actualizada para la receptividad endometrial con uso clínico, más completa y menos invasiva que las existentes actualmente.

Los objetivos específicos de este proyecto son:

1. Estudio de los efectos del cobre sobre la apoptosis de células endometriales estromales in vitro.
2. Estudio de la formación de la red de microtubulos apoptóticos (AMN) en células endometriales estromales.
3. Selección de marcadores de receptividad endometrial y respuesta inmunológica.
4. Estudio de la influencia del cobre en el perfil de expresión génica de dichos marcadores en células endometriales estromales decidualizadas.
5. Estudio prospectivo de la expresión de dichos marcadores en biopsias endometriales en donantes fértiles y pacientes subfértiles.
6. Uso de herramientas bioinformáticas para establecer el perfil de receptividad endometrial y crear un clasificador predictivo del estadio endometrial con posible aplicación clínica.
7. Estudio prospectivo de la expresión de dichos marcadores en los exosomas de plasma, suero y orina.





# 5. DISEÑO EXPERIMENTAL



En la figura 13 se resumen, de forma gráfica, los objetivos de este estudio.

En este estudio han contribuido en gran medida dos clínicas españolas, IVF Spain en Alicante y Ginemed en Sevilla, siendo estas las encargadas del reclutamiento de las pacientes y de la obtención de las muestras. La mayor parte del trabajo experimental se ha realizado en el Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CABD) en la Universidad Pablo de Olavide, realizándose los estudios de PCR en microfluidos de Biomark HD de Fluidigm en el Institut's D'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) en Barcelona.

Se utilizaron 5 biopsias endometriales para el estudio del efecto del cobre sobre la apoptosis y la receptividad endometrial, 138 biopsias para el desarrollo de la herramienta de evaluación endometrial, y 6 muestras de orina, plasma y suero para estudiar su utilidad en el diagnóstico de receptividad.

Para alcanzar el objetivo 1 se realizaron citometrías de flujo con anexina y yoduro de propidio por triplicado en HESC, decidualizadas decidualizadas durante 8 días, y decidualizadas con cobre o con camptotecina (CPT, marcador positivo de apoptosis). De esta manera se podía estudiar los efectos de la decidualización in vitro, del cobre a los niveles liberados por los DIU y del CPT en la apoptosis y necrosis celular.

Para lograr el objetivo 2 se procedió a utilizar anticuerpos anti-tubulina, anti-actina y Hoechst para marcar el núcleo para ver la morfología celular. Este estudio nos permitía ver de una manera visual la morfología celular de las HESC, dHESC y ver los efectos del cobre y del CPT, así como la posibilidad de ver células en la fase de ejecución de la apoptosis durante la cual se forma el AMN.

Para el objetivo 3 se realizó en un primer lugar una búsqueda bibliográfica en Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) con distintos términos relacionados con la receptividad endometrial, la respuesta inmunológica

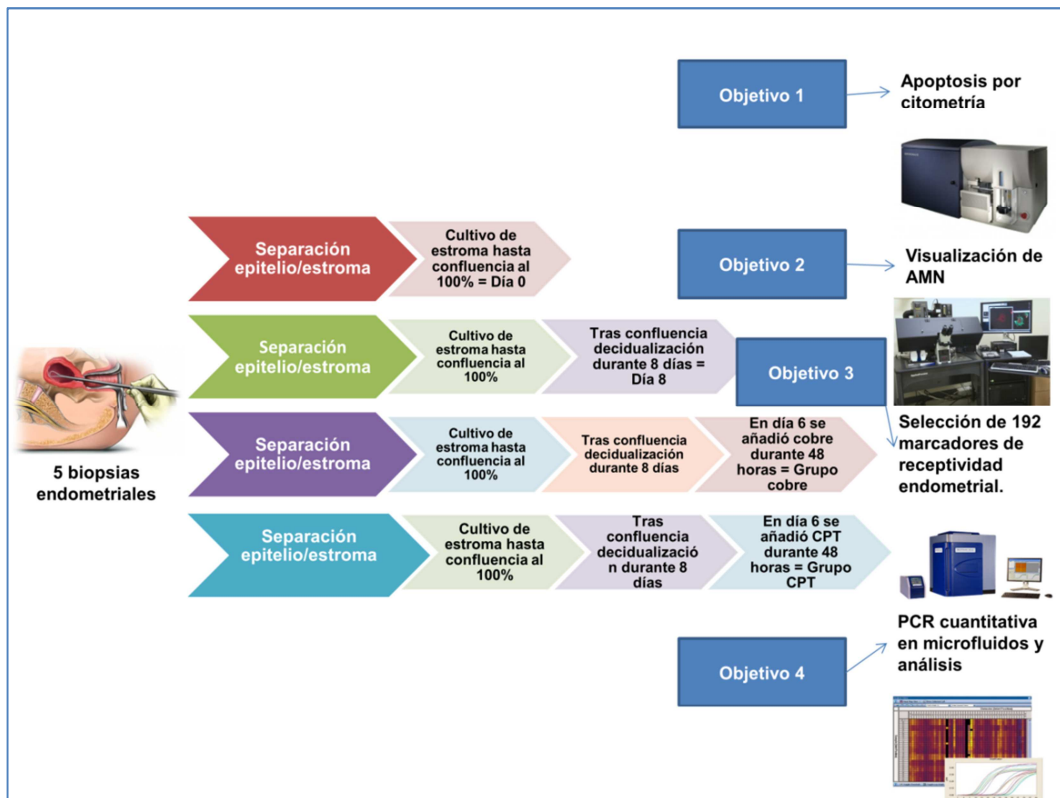
y la ventana de implantación embrionaria con el objetivo de seleccionar aquellos términos que nos arrojaran más resultados. En segundo lugar se acotó los años a partir de los cuales se considerarían los estudios válidos, dando prioridad a los estudios novedosos. Una vez seleccionados, se diseñaron los oligonucleótidos seleccionando características que nos permitieran seleccionar aquellas parejas de oligonucleótidos específicas para un único gen de manera que no se produjeran productos inespecíficos.

En el objetivo 4 se utilizaron 5 muestras de HESC en 4 situaciones experimentales distintas: sin decidualizar, decidualizadas, decidualizadas tratadas con cobre y decidualizadas tratadas con CPT, y al menos 3 controles en cada array de microfluidos. Los análisis de los resultados se realizarían con el software *Fluidigm Real-Time PCR Analysis* que permiten obtener qué pocillos habían, o no, funcionado correctamente y obtener los Ct para cada gen y cada muestra. A partir de aquí se realizaría un análisis estadístico de todos los genes normalizados a través de los 8 *housekeeping* para extraer las conclusiones oportunas en cuanto al efecto de la decidualización, del cobre y del CPT en la expresión génica de los genes de receptividad endometrial y de respuesta inmunológica.

El objetivo 5 se diseñó teniendo en cuenta estudios anteriores y se obtuvieron 16 biopsias endometriales en donantes fértiles (pre-receptivas LH+2 y receptivas LH+7) y en 106 pacientes subfértiles (P+5). Estas biopsias fueron criopreservadas *en RNAlater* a -20°C hasta la extracción del RNA total.

Para el objetivo 6 se diseñaron distintos análisis bioinformáticos para ver cuál de ellos era más fiable y eficaz permitiendo clasificar los endometrios en las distintas fases de receptividad endometrial. El plan consistía, además, en reducir el número de genes necesarios a estudiar para la correcta clasificación de estas muestras, permitiendo así una reducción de los tiempos y costes tanto para las clínicas como para los pacientes.

Para el objetivo 7 se utilizaron tres muestras de orina, plasma y suero en pacientes fértiles (LH+2 y LH+7) para obtener el RNA contenido en los exosomas. El objetivo era determinar si sería posible cuantificar los RNAm de nuestros genes seleccionados en los exosomas de estas biopsias líquidas y si este enfoque nos permitiría discernir los endometrios receptivos de otros estados en los que no implantaría el embrión.



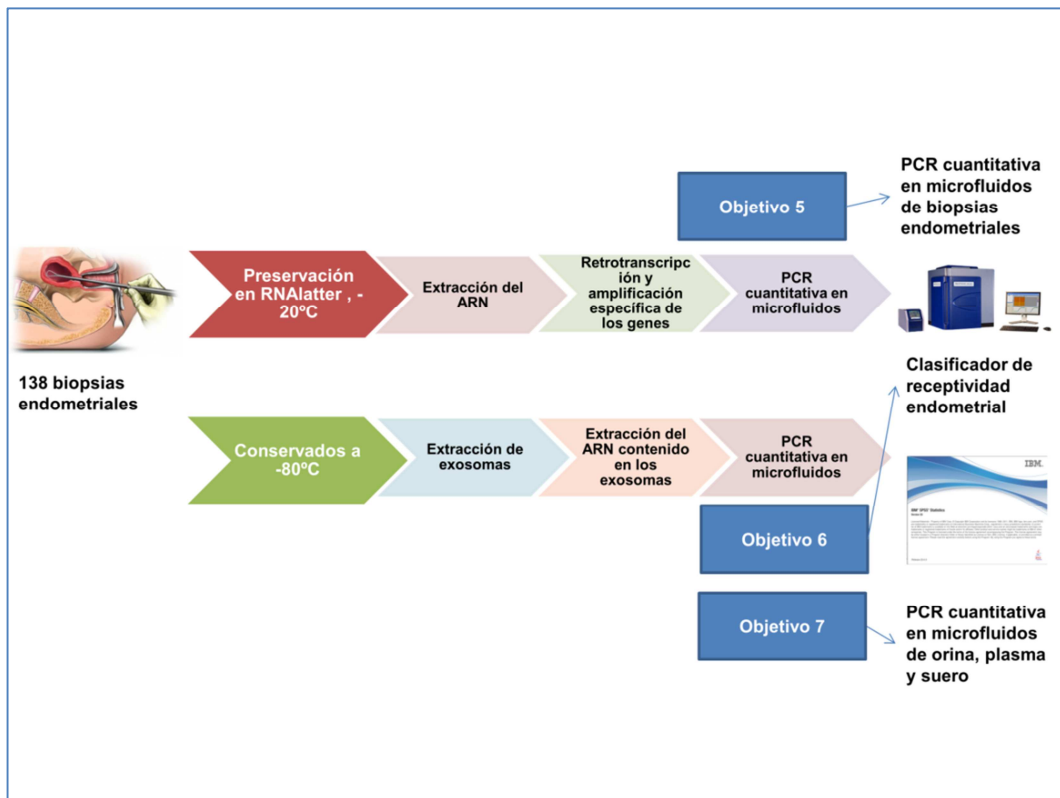


Figura 13. Esquema del diseño experimental seguido en esta tesis doctoral.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS





## 6.1. Recolección de muestras

Este estudio siguió las directrices acordadas por la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla (Sevilla, España, CEI#2014PI/025) (anexo I). El consentimiento informado fue rellenado y firmado por todas las pacientes. Un modelo de consentimiento informado utilizado en este proyecto se encuentra en el anexo II.

Las biopsias endometriales para el estudio del efecto del cobre fueron obtenidas en la Clínica Ginemed, Sevilla (España) a través de una cánula Pipelle de Cornier (Genetics, Namont-Achel, Bélgica) en condiciones estériles del fondo uterino.

Las biopsias endometriales para el estudio de la receptividad endometrial in vivo se obtuvieron en la clínica IVF Spain, Alicante (España) y la clínica Ginemed, Sevilla (España) utilizando la misma técnica mencionada. Las muestras fueron obtenidas de dos grupos diferentes: **grupo A, mujeres fértiles** (<37 años), caucásicas, con ciclos regulares y un índice de masa corporal normal (25-30 kg/m<sup>2</sup>). Se obtuvieron 16 biopsias endometriales fueron obtenidas en dos días diferentes del ciclo endometrial, 2 (LH+2) y 7 días (LH+7) después del pico de la hormona luteinizante (LH). **Grupo B, reemplazo hormonal:** se tomaron 106 biopsias endometriales a mujeres en terapia de reemplazamiento hormonal (HRT) en día 5 tras la primera administración de la hormona progesterona (P).

Se obtuvieron además muestras de plasma, suero y orina de mujeres fértiles en LH+2 y LH+7, conservándose a -80°C hasta su posterior uso. Todas las pacientes fértiles, candidatas para programas de donación de ovocitos fueron reclutadas por IVF-Spain, en Alicante, España y firmaron el consentimiento informado.

## 6.2. Separación de epitelio y estroma y cultivo celular

Las muestras obtenidas para cultivo celular fueron procesadas siguiendo un protocolo estándar de filtración y separación se consiguieron obtener las HESC (Simón y cols., 1999). Las HESC fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%(p/v) (Merck Millipore, Berlin, Germany), Penicilina-Estreptomicina-Fungizona al 1X (Lonza, Walkersville, USA) y 5µ/ml de gentamicina (Lonza, Walkersville, USA) hasta su llegada a confluencia. Una vez las HESC llegaban a la confluencia (día 0) se comenzaba el tratamiento de decidualización por seis días añadiendo al medio medroxiprogesterona 17-acetato al 1µM (MPA, Sigma, St. Louis, MO, USA), β-estradiol 10nM (E2, Sigma, St. Louis, MO, USA) y 8-bromoadenosin monofosfato cíclico al 0,3 mM (AMPc, Sigma, St. Louis, MO, USA,) (Kasahara y cols., 2001). En el control de decidualización se continuó el tratamiento por dos días más (día 8) mientras que en los cultivos en estudio, el día 6, se añadió cobre ( $1,98 \cdot 10^{-4}$ ) al grupo de tratamiento, o 10 µM camptotecina (CPT) (Alexis Corporation, Nottingham, UK) como control positivo de apoptosis durante 48 h.

## 6.3. Inmunofluorescencia

Las HESC fueron cultivadas sobre cubreobjetos de 1mm (Goldseal No. 1), lavadas con PBS1X, fijadas con paraformaldehído al 3,8% (v/v) durante 5 min a temperatura ambiente, y permeabilizadas con saponina al 0,1% (p/v) durante 5 min. Para la inmunotinción, los cubreobjetos fueron incubados a 37°C con anticuerpos primarios diluidos en PBS1X al 1:100 durante 1h en un incubador. El exceso de anticuerpo fue retirado mediante lavados de los cubreobjetos con PBS1X (tres veces durante 5 min). El anticuerpo secundario estaba marcado con FITC y era *goat anti-rabbit* (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), diluido 1:100 en PBS1X. Se añadió e incubó durante 1 h a 37°C. Los cubreobjetos se lavaron con PBS1X (tres veces durante 5 min) y se incubaron con falloidina diluida 1:25 en PBS1X durante 5 min a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se lavaron

con PBS1X (3 veces, durante 5 min), se incubaron con Hoechst 33342 (1µg/ml) durante 5 min a temperatura ambiente. Tras esto se lavaron con PBS1X (5 min (3X)). Finalmente, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos utilizando para ello el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) visualizándolos en un microscopio invertido de fluorescencia (IX81-ZDC2 Zero Drift Monitorized Inverted Microscope, Center Valley, PA, USA) y analizándolos en un microscopio Deltavision Elite microscope (AppliedPrecision, Issaquah, WA, USA). Estudios de deconvolución y proyecciones 3D fueron realizadas a través del software e Softworx (AppliedPrecision).

#### 6.4. Citometría de flujo

Para determinar el nivel de células vivas y de células apoptóticas se siguió el protocolo estándar suministrado por Santa Cruz Biotechnology (Annexin V-FITC: sc-4252 AK). Las HESC fueron tripsinizadas y transferidas a tubos cónicos de 15 ml. Se obtuvo un *pellet* celular por centrifugación a 1.500 rpm durante 5 min. Se lavaron adecuadamente con medio de cultivo con suero. Tras esto, las células se lavaron con PBS1X y se resuspendieron en tampón de ensayo a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Después, se alicuotaron 100µl de células ( $1 \times 10^5$  células) y se transfirieron a un tubo de cultivo de 5ml y se añadió 1µg/ml de anexina V-FITC y 1µg/ml de yoduro de propidio (PI). Los controles negativos que se incluyeron fueron: (1) sin anexina V-FITC ni PI; (2) con anexina V-FITC sólo y (3) con PI sólo. Posteriormente las muestras fueron agitadas e incubadas durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Una vez pasado este tiempo, inmediatamente se analizaron las muestras por citometría de flujo. Para detectar la anexina unida a la fosfatidilserina que se acumula en la membrana plasmática durante la apoptosis temprana se utilizó unas longitudes de onda de excitación-emisión de 488nm y 499nm respectivamente, mientras que en el caso del PI se utilizó unas longitudes de onda de 535nm y 617nm.

## 6.5. Selección de genes de receptividad endometrial

Para la selección de los marcadores más relevantes y específicos de este proceso, se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica de los trabajos científicos existentes, centrándonos en los artículos sobre marcadores de receptividad endometrial y respuesta inmunológica a la implantación desde el año 2005. Para esta selección se consultó en la base de datos de libre acceso de MEDLINE, de citas y resúmenes de artículos de investigación biomédica, ofrecida por la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos. Para localizar los artículos en esta base de datos se utilizó el motor de búsqueda PubMed, en la página web del NCBI (anexo VI), y se introdujeron diversos títulos para la búsqueda: “*endometrial receptivity markers*”, “*endometrial receptivity*”, “*embryonic implantation*”, “*window of implantation*”, “*immune response in embryonic implantation*”, “*markers of embryonic implantation*”, “*gene expression & endometrium*”, “*microarray & endometrium*”.

## 6.6. Análisis funcional

Para detectar funciones biológicas o rutas metabólicas de los genes seleccionados, se utilizó una base de datos integrada de anotación, visualización e integración (*database for annotation, visualization and integrated discovery*, DAVID) version 6.7 (Huang y cols., 2009), con un algoritmo basado en la lista de los genes que detecta representaciones significativas de los genes relacionados funcionalmente en la lista, ordenados por el p-valor. DAVID puede detectar bloques de genes relacionados funcionalmente por diferentes criterios como rutas metabólicas KEGG, términos del *Gene Ontology* (GO) y otros.

Para proporcionar una evaluación e integración crítica de las interacciones proteína-proteína se utilizó la herramienta *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* (STRING) v10.0 (Szklarczyk y cols., 2015) que representa las conexiones utilizadas entre los genes seleccionados en

esta herramienta de evaluación endometrial. Se seleccionó las interacciones experimentos, bases de datos, datos de co-expresión, de fusión de genes y *clusters* vecinos con una co-ocurrencia del 0,899.

## 6.7. Diseño de oligonucleótidos y validación

El diseño de las sondas de oligonucleótidos se realizó con el programa informática Genefisher 2.6 (anexo VI) con las siguientes características: de 16 a 25 pb y contenido en C/G de 45-55%. Se utilizó la herramienta de Fluidigm D3 Assay Design (anexo VI) para obtener los oligonucleótidos diseñados con anterioridad. Tras la recepción de los oligonucleótidos, que venían en dos placas de 96 pocillos cada una, se procedió a centrifugar unos segundos las placas para bajar los restos de las paredes, en centrífuga Megafune 1.0 de Heraeus instruments, y se pasaron a tubos eppendorf esterilizados. Los oligonucleótidos venían a concentración de 100μM, en un volumen medio de 100μL. Se hicieron diluciones 1:10 (90μL de agua esterilizada y 10μL de oligonucleótidos) para ajustar la concentración de oligonucleótidos para la aplicación del protocolo de PCR de la enzima elegida, MyTaq DNA Polymerase (Bioline, Londres, Reino Unido). Las diluciones se mantuvieron a 4°C y los oligonucleótidos concentrados a -20°C.

Se determinó la temperatura óptima de hibridación de cada pareja de oligonucleótidos, usando el software Serial Cloner 2.6, un potente software de biología molecular con múltiples herramientas para análisis de secuencias, entre otras aplicaciones. Para ello, se introdujo la secuencia de DNA de cada oligonucleótido uno a uno, directo y reverso, en la aplicación, y después se hizo la media de cada pareja para determinar la temperatura teórica de hibridación. A este resultado se le restaron 3°C según el protocolo de la enzima (recomendaba bajar entre 2 y 5°C), siendo ésta la temperatura óptima de hibridación.

Se usaron, para las reacciones de amplificación de PCR, el termociclador BIORAD T100, y el termociclador *TGradient* de Biometra, siguiendo el protocolo de la enzima, para comprobar a qué temperatura real hibridaban los

oligonucleótidos, y si hibridaban correctamente. Se usó un volumen inicial de 50µl que posteriormente se cambió a 25µl. El protocolo se optimizó añadiendo una etapa final de extensión de 10 min a 72°C. Se usó cDNA de endometrio humano, obtenido de biopsias a donantes de ovocitos, a concentración de 170nM/µL como molde. Los resultados de la PCR se comprobaron haciendo electroforesis en gel de agarosa al 2%(p/v) en TBE1X con el 10% del producto de la PCR en *BIO-RAD Power Pac 200* a 5v/cm.

Los oligonucleótidos que no pudieron validarse tras diversos ensayos se desecharon, y se procedió al diseño de nuevos oligonucleótidos haciendo uso del programa informático *GeneFisher 2.6* (anexo VI). Se consultó la secuencia del RNAm de cada marcador en la base de datos del *Nacional Centre of Biotechnology Information* (NCBI), de EEUU, entidad que almacena y actualiza datos biotecnológicos relevantes en diferentes bases de datos (anexo VI). De la secuencia completa del RNAm se extrajo, a su vez, la secuencia de los exones del extremo N-terminal de cada proteína, hasta unas 400pb. Las secuencias obtenidas de esta manera fueron introducidas en el programa *GeneFisher 2.6* en formato Fasta con las condiciones siguientes: cada par de oligonucleótidos con una longitud de 18-22 pb, temperatura de hibridación de 56-58° C, producto de PCR de 100-150 pb, contenido en C/G de 45-55% y el extremo 3' de la secuencia acabado en C/G. Con estas condiciones el programa reportó, de cada marcador, varias combinaciones de parejas de oligonucleótidos directo y reverso, y fueron seleccionadas aquellas parejas cuyas secuencias incluían, al menos, a dos exones. Se utilizó un programa de hibridación de secuencias de tipo local (BLAST) que compara secuencias de DNAs, RNAs o proteínas, para comprobar la homología entre los oligonucleótidos diseñados y las secuencias incluidas en la base de datos del NCBI. Se realizó un tipo específico de BLAST para RNAm, denominado Blastn, con el que pudimos confirmar que la mayoría de los oligonucleótidos estaban correctamente diseñados y se correspondían con la secuencia específica del RNAm del gen seleccionado (anexo VI). El proceso se repitió de nuevo para algunos pares de oligonucleótidos cuya secuencia no alineaba con la secuencia con la que tenía que alinear.

## 6.8. Aislamiento de RNA total

### 6.8.1 Células endometriales estromales en cultivo

Se obtuvo el RNA total mediante el método del Trizol de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). En resumen, se añadió a las muestras 1ml Trizol por cada  $3 \times 10^6$  células, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron 0,2 volúmenes de cloroformo a las muestras y se volvió a incubar a temperatura ambiente durante 3 min. Tras esto, las muestras mencionadas fueron centrifugadas a 12.000xg durante 15 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo al cual se le añadió 0,5 volúmenes de isopropanol. Se dejó durante 5 min sobre hielo y se centrifugó durante 10 min a 12.000xg. El *pellet* obtenido se disolvió en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). La pureza y concentración del RNA total se confirmó mediante el espectrofotómetro NanoDrop 1.000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) y la integridad de las muestras de RNA fue evaluada por el sistema de electroforesis automático Experion (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

### 6.8.2 Biopsias endometriales

Tras la recolección de las biopsias endometriales, éstas fueron depositadas inmediatamente en criotubos con 1ml de RNAlater (un estabilizador y protector del RNA) y guardadas a 4°C durante al menos 4 h (para permitir a la solución de RNAlater penetrar por todo el tejido). Al siguiente día, las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento. El RNA total fue extraído mediante el RNeasy mini kit (Qiagen, London, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, las biopsias endometriales fueron homogenizadas utilizando 30mg de tejido en 600 µl de tampón de lisis con perlas de vidrio (Sigma Aldrich Corp, St Louis, MO) en el homogeneizador de muestras *Ribolyser*

(Bio-Rad Laboratories, Madrid, España) durante 45 seg a una intensidad de 6,5. Se pasaron las muestras lisadas a tubos nuevos y se centrifugaron durante 3 min a 16.000xg. Los sobrenadantes fueron transferidos a nuevos tubos eppendorfs de 1,5ml y se mezclaron con 600 µl de etanol al 70% (v/v) en agua DEPC. Las muestras se pasaron a través de las minicolumnas RNeasy que estaban en los tubos de colección de 2 ml y se centrifugaron durante 15 seg a 8.000xg descartándose los sobrenadantes. Se añadió 700µl de tampón RWI a las minicolumnas RNeasy y se volvió a centrifugar durante 15 seg a 8.000xg descartándose el sobrenadante. Se realizó un primer lavado añadiéndose 500µL de tampón RPE a las minicolumnas RNeasy, se centrifugaron durante 15 seg a 8.000xg y se desechó el sobrenadante. El segundo lavado con el mismo tampón se realizó durante 2 min a 8.000xg desechando el sobrenadante tras la centrifugación. Las columnas de RNeasy se colocaron en los tubos colectores de 1,5 ml. A las muestras, ya sobre hielo, se le añadieron de 30–50µl de agua libre de RNasas directamente a la membrana de las columnas y se centrifugó durante 1 min a 8.000xg para eluir el RNA total. La pureza y concentración del RNA total se confirmó por el mismo método previamente mencionado.

## 6.9. Extracción de exosomas y purificación de RNA total

Para la obtención de exosomas a partir de biopsias líquidas se utilizaron kits de purificación, para las muestras de plasma se utilizó el kit *Total Exosome Isolation Kit (from plasma)* (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Para las muestras de suero se utilizó el kit *Total Exosome Isolation Kit (from serum)* (Invitrogen) y para las muestras de orina se utilizó el kit *Total Exosome Isolation Kit (from urine)* (Invitrogen). Una vez purificados los exosomas, se empleó el *Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit* (Invitrogen) para aislar el RNA total contenido en los exosomas. A través de una extracción orgánica y una inmovilización del RNA en filtros de fibra de vidrio, se consigue purificar el RNA total.



## 6.10. PCR cuantitativa en microfluidos

Para las muestras de RNA total procedentes de cultivo celular o biopsias endometriales utilizó el *Master Mix Fluidigm Reverse Transcription* (Fluidigm, San Francisco, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El rango de concentraciones del RNA empleado fue de 70-200ng/ $\mu$ L, utilizando 1 $\mu$ L de RNA en un volumen de reacción de RT de 5 $\mu$ L. La amplificación específica de los genes de interés se llevó a cabo con el Master Mix Fluidigm PreAmp (Fluidigm, San Francisco, CA) y con los oligonucleótidos de DELTAgene siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, el proceso consistió en mezclar los oligonucleótidos DELTAgene con los CDNA y con el Master Mix Preamp 5x, realizando reacciones de preamplificación por 14 ciclos, y diluir los productos.

Las reacciones de RT-PCR cuantitativas se realizaron siguiendo el manual *Fast Gene Expression Analysis Using Evagreen on the Biomark HD System* (PN 100-3488, Rev.C1) (Fluidigm, San Francisco, CA) y un array dinámico IFC 96.96. Las reacciones se llevaron a cabo con el Master Mix *SsoFast™ EvaGreen® Supermix* con *Low ROX* (Bio-Rad Laboratories, Madrid Spain) y con los oligonucleótidos DELTAgene a una concentración de 500nM. Los análisis de calidad de los resultados se realizaron con el software Fluidigm Real Time PCR Analysis versión 4.1.3.

Para las muestras de RNA total procedentes de exosomas se usó el *Fluidigm Reverse Transcription Master Mix* (Fluidigm, San Francisco, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El rango de concentraciones de RNA que se utilizó fue menor a 20ng/ $\mu$ L, por lo que se utilizó 1 $\mu$ L de RNA en cada reacción RT en un volumen de 5 $\mu$ L. La amplificación selectiva de nuestros genes de interés se llevó a cabo a través del *Fluidigm PreAmp Master Mix* (Fluidigm, San Francisco, CA) y de los DELTAgene siguiendo las instrucciones del proveedor, de esta manera sólo se amplificaban los genes a estudiar. A continuación, se mezclaron los DELTAgene, se añadió el cDNA y el 5x *PreAmp Master Mix*, realizándose reacciones de pre-amplificación durante 20 ciclos. Este

protocolo de 20 ciclos se debe al bajo número de copias de DNA obtenido (baja concentración inicial de RNA), y es el utilizado para los experimentos de *single cell gene expression*.

Las reacciones de qRT-PCR se realizaron siguiendo las instrucciones de *Fast Gene Expression Analysis Using Evagreen on the Biomark HD System, Advanced Development Protocol* (PN 100-3488, Rev.C1) (Fluidigm, San Francisco, CA) y para los arrays dinámicos 96.96 o 48.48. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el *Master Mix Mix SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX* (Bio-Rad Laboratories, Madrid Spain) y DELTAgenes a una concentración de 500nM. Los resultados fueron analizados utilizando el software Fluidigm Real Time PCR Analysis, versión 4.1.3.

## **6.11. Análisis de los datos obtenidos por PCR cuantitativa**

## **6.12. Análisis de componentes principales (PCA)**

Para los datos de expresión génica obtenidos de cultivo celular, la normalización de todos los genes se realizó utilizando una media geométrica de los genes constitutivos, y estos valores, fueron utilizados para construir un predictor de decidualización de HESC in vitro. Se realizó un PCA con el programa estadístico *SPSS Statistics* versión 19.0 para clasificar las distintas muestras de estroma endometrial según su firma genética de los 192 genes de la WOI.

Para los datos de expresión génica procedentes de las biopsias endometriales se normalizaron los datos realizando la media geométrica con los genes constitutivos. Se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) utilizando el software *IBM SPSS Statistics* versión 19.0 y los datos obtenidos en los experimentos de Fluidigm de 96 y 192 genes. A través del PCA

se consiguió reducir el número de variables a aquellas que representan la mayor parte de la variabilidad muestral.

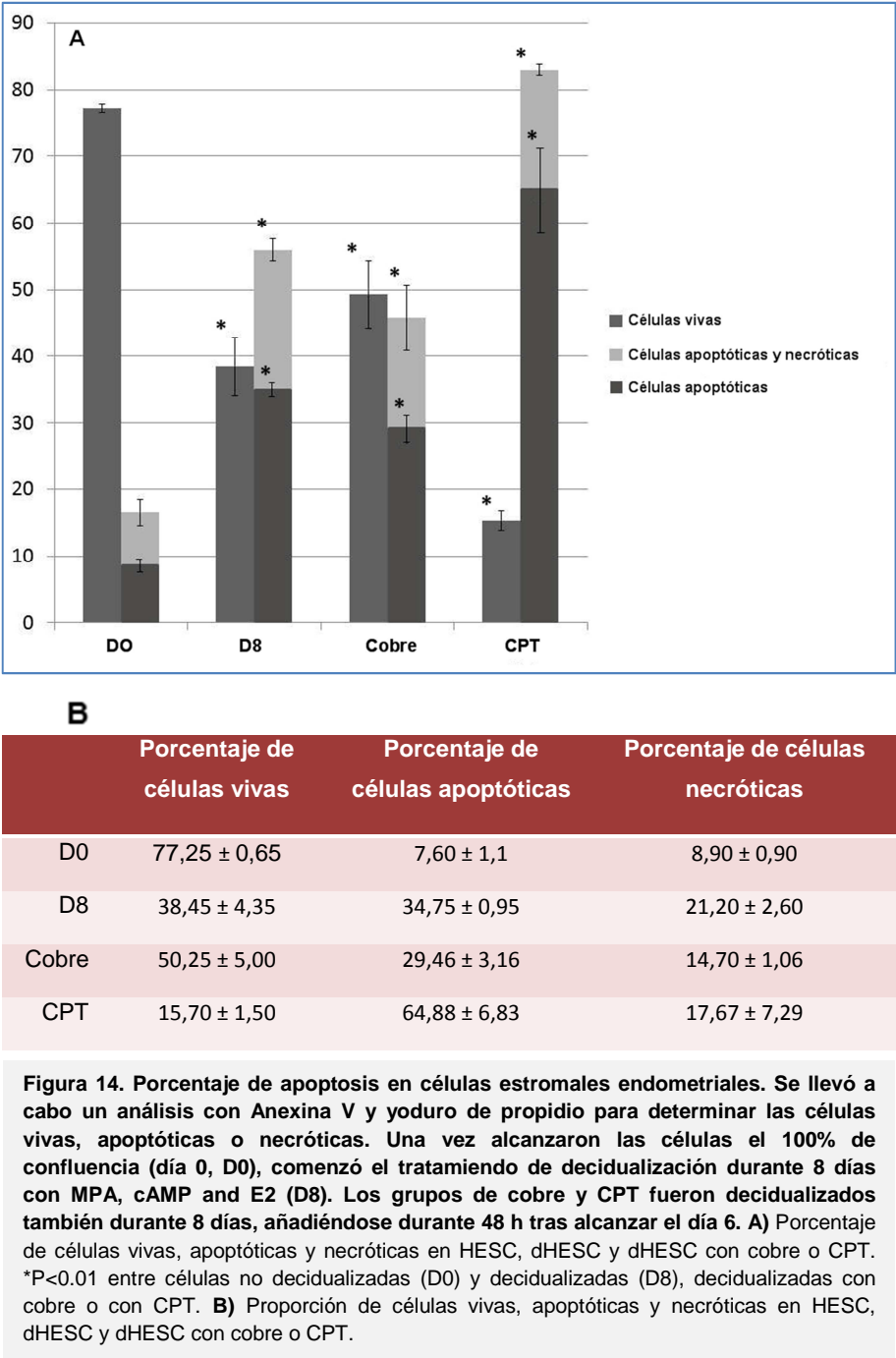


## **7. RESULTADOS**



### **7.1. Efecto de la decidualización y el tratamiento con cobre sobre las células endometriales estromales humanas (HESC)**

El efecto del tratamiento de decidualización con E2, MPA y AMPc durante 8 días en células humanas estromales de endometrio (dHESC, del inglés *decidualized Human Endometrial Stromal Cells*), tuvo un gran impacto en los niveles de apoptosis y necrosis en estas células, alcanzando el 50%, cuando el porcentaje de muerte celular en células en cultivo in vitro sin el tratamiento de decidualización no alcanzó el 20% (figura 14A). Cuando las dHESC fueron tratadas con cobre, durante 48h, alrededor de un 50% de las células se encontraban en apoptosis o necrosis, al igual que las células sin tratamiento. Al comparar los niveles de apoptosis y necrosis entre dHESC con y sin cobre, no se encontraron cambios significativos en los niveles de apoptosis y necrosis celular, mostrando, incluso, el cobre, un efecto levemente protector (figura 14B). El tratamiento con CPT, un fármaco anticancerígeno que inhibe la enzima DNA topoisomerasa I, incrementó los niveles de apoptosis y necrosis celular más de un 80%, tal y como se esperaba (figura 14B).

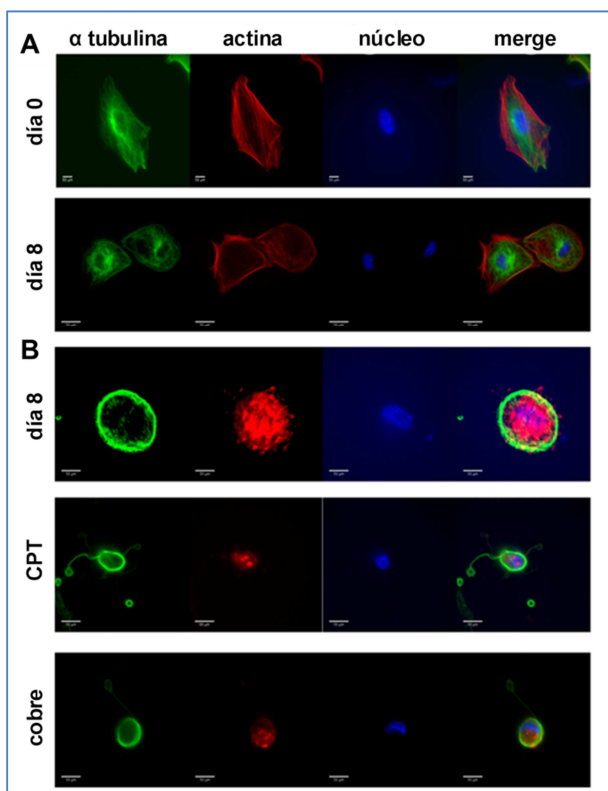




## **7.2. Formación del AMN durante la apoptosis celular en dHESC**

Las HESC, tras 8 días de tratamiento de decidualización, y 48 h con cobre o CPT, sufrieron procesos apoptóticos en los que se podían observar, en aquellas que se encontraban en la fase de ejecución, núcleos fragmentados y la red de microtúbulos apoptóticos (AMN). En las células control, antes de experimentar el proceso de decidualización, los microtúbulos se disponían en su distribución típica en las HESC con la actina organizada por debajo de la membrana plasmática y la tubulina formando un red de microtúbulos cruzando por todo el interior celular (figura 15A) . La población celular viva de dHESC en día 8 mostraba un patrón de distribución de los componentes del citoesqueleto distinto, ya que aunque la tubulina y la actina estaban presentes en la misma zona, el proceso de decidualización había modificado la morfología celular (figura 15A).

Las células apoptóticas, tras el proceso de decidualización, tanto en presencia como en ausencia de cobre o CPT, no mostraban el anillo de actina en la corteza del interior celular ni organización fibrilar, mostrándose de manera difusa y desorganizada en el interior celular. Los microtúbulos de tubulina se encontraban formando una red compleja en el citoplasma celular de las células control, por el contrario, en las células apoptóticas en fase de ejecución formaban el AMN en la corteza celular (figura 15B). El tipo de apoptosis celular producido en estas células en las condiciones experimentales testadas es de tipo lento o redondeado, como se puede apreciar en la figura 15B.



**Figura 15. HESC y dHESC vivas y durante la fase de ejecución de la apoptosis mostrando el AMN.** Imágenes de microscopía de fluorescencia en las que se ven la  $\alpha$ -tubulina, la actina y el núcleo en HESC en día 0, en dHESC en día 8, y en dHESC en día 8 con cobre o CPT **A)** Células vivas de HESC en día 0, y de dHESC en día 8 con la distribución típica de  $\alpha$ -tubulina y de actina. **B)** Células apoptóticas durante la fase de ejecución de la apoptosis con el AMN en HESC en día 8 y en HESC en día 8 con cobre o

### 7.3. Selección de marcadores de receptividad endometrial y respuesta inmunológica en el endometrio humano

Utilizando los criterios de búsqueda especificados en materiales y métodos, se procedió a una exhaustiva revisión bibliográfica de todos los artículos publicados desde el año 2005 y se seleccionaron 192 genes cuya expresión está relacionada con la receptividad endometrial y respuesta inmunológica en el endometrio humano. A estos genes se les llamó, genéricamente, genes de la ventana de implantación, abreviadamente: genes **WOI** (de sus siglas en inglés, *Window Of Implantation*). Estos 192 genes WOI relacionados con receptividad endometrial y respuesta inmunológica aparecían en 71 artículos científicos publicados entre los años 2005 y 2015 en la *US National Library of Medicine* (anexo VI). Esta lista de genes se muestra en la tabla II. La selección génica incluye 8 genes constitutivos (*housekeeping*) que

fueron escogidos para normalizar los datos de expresión génica. Estos genes son: actina (ACTN), beta 2 microglobulina (B2M), citocromo 1 (CYC1), pseudouridina metiltransferasa EMG1 N1-específica (EMG1), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), proteína de unión a caja TATA (TBP), topoisomerasa de DNA I (TOP1) y proteína z de activación tirosina-3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa (YWHAZ). Los genes constitutivos se encuentran resaltados en negrita en la tabla II.

SG	Nombre del gen	Referencia	SG	Nombre del gen	Referencia
MMP8	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	Altmäe (2010)	LCP1	Lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	Haouzi (2009)
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	Jee (2009)	CD55	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)	Mirkin (2005)
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	Gao (2012)	MAP3K5	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	Tapia (2011)
LRPPRC	Leucine-rich PPR-motif containing	Wanggren (2007)	CXCL6	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6	Altmäe (2010)
PROK1	Prokineticin 1	Evans (2008)	CMTM5	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5	Altmäe (2010)
ANGPTL1	Angiopoietin-like 1	Haouzi (2009)	ITGA8	Integrin, alpha 8	Altmäe (2010)
APOL2	Apolipoprotein L, 2	Chen (2015)	SCGB3A1	Secretoglobin, family 3A, member 1)	Altmäe (2010)
MMP10	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	Zhao (2010)	IFNG	Interferon gamma	Labarta (2011)
ESR1	Estrogen receptor 1	Gao (2012)	CCR7	Chemokine (C-C motif) receptor 7	Altmäe (2010)

SG	Nombre del gen	Referencia	SG	Nombre del gen	Referencia
ESR2	Estrogen receptor 2 (ER beta)	Altmäe (2010)	FAM3D	Family with sequence similarity 3, member D	Altmäe (2010)
ALDH1A3	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	Haouzi (2009)	FAM3B	Family with sequence similarity 3, member B	Altmäe (2010)
S100A10	S100 calcium binding protein A10	Haouzi (2009)	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	Barnea (2012)
S100A2	S100 calcium binding protein A2	Altmäe (2010)	TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	Barnea (2012)
MT1H	Metallothionein 1H	Ruiz-Alonso (2012)	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	Barnea (2012)
MT1E	Metallothionein 1E	Ruiz-Alonso (2012)	NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	Barnea (2012)
MT1F	Metallothionein 1F	Ruiz-Alonso (2012)	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	Kalantaridu u (2007)
MUC5B	Mucin oligomeric mucus/gel-forming 5B,	Altmäe (2010)	FUT4	Fucosyltransferase 4 (alpha (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific)	Ponnampal am and Rogers, (2008)
ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	Díaz-Gimeno (2011)	LPAR3	Lysophosphatidic acid receptor 3	Wei (2009)
CSRP2	Cysteine and glycine-rich protein 2	Liu (2008)	GJA4	Gap junction protein, alpha 4, 37kDa	Ruiz-Alonso (2012)
CATSPER B	Catsper channel auxiliary subunit beta	Grewal (2008)	PTGER3	Prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3)	Catalano (2011)
GAST	Gastrin	Horcajadas (2005)	RACGAP1	Rac GTPase activating protein 1	Grewal el al. (2008)

SG	Nombre del gen	Referencia	SG	Nombre del gen	Referencia
CLU	Clusterin	Teles (2013)	EREG	Epiregulin	Barnea (2012)
IER3	Immediate early response 3	Díaz-Gimeno (2011)	BTC	Betacellulin	Barnea (2012)
SLPI	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	Mirkin (2005)	RHOA	Ras homolog family member A	Heneweer (2005)
ARG2	Arginase 2	Díaz-Gimeno (2011)	WISP2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	Altmäe (2010)
DEFB1	Dickkopf signaling pathway inhibitor 1	WNT Das (2007)	ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	Zhao (2010)
GDF15	Growth differentiation factor 15	Díaz-Gimeno (2011)	ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	Zhao (2010)
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	Zhao (2010)	ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	Hannan (2008)
MFAP5	Microfibrillar associated protein 5	Haouzi (2009)	TNC	Tenascin	Zhao (2010)
KCNG1	Potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1	Díaz-Gimeno (2011)	MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3	Barnea (2012)
SPDEF	SAM pointed domain containing ETS transcription factor	Díaz-Gimeno (2011)	NFKBIE	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	Barnea (2012)
EPHB3	EPH receptor B3	Díaz-Gimeno (2011)	ITGA9	Integrin, alpha 9	Barnea (2012)
OPRK1	Opioid receptor, kappa 1	Díaz-Gimeno (2011)	PTPRZ1	Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	Barnea (2012)
LRRC17	Leucine rich repeat containing 17	Díaz-Gimeno (2011)	HOXB7	Homeobox B7	Ruíz-Alonso (2012)
IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	Díaz-Gimeno (2011)	PPP2R2C	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma	Barnea (2012)
CDA	Cytidine deaminase	Díaz-Gimeno	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	Paiva

SG	Nombre del gen	Referencia	SG	Nombre del gen	Referencia
		(2011)			(2011)
TAGLN2	Transgelin 2	Haouzi (2009)	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Vestergaard (2011)
CRISP3	Cysteine-rich secretory protein 3	Díaz-Gimeno (2011)	<b>B2M</b>	<b>Beta-2-microglobulin</b>	<b>Vestergaard (2011)</b>
IL15	Interleukin 15	Franchi (2008)	IL8	Interleukin 8	Hess (2007)
LIF	Leukemia inhibitory factor	Dimitriadis (2006)	CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	Dimitriadis (2005)
GNLY	Granulysin	Díaz-Gimeno (2011)	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	Petitbarat (2011)
VCAM1	Vascular adhesion molecule 1	Zhao (2010)	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	Otsuka (2007)
COL16A1	Collagen, type XVI, alpha 1	Hannan (2008)	IL2	Interleukin 2	Otsuka (2007)
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	Díaz-Gimeno (2011)	MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	Barnea (2012)
SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	Mirkin (2005)	IL1B	Interleukin 1, beta	Dimitriadis (2005)
HBEGF	Heparin-binding EGF-like growth factor	Aghajanova (2008)a	IL4	Interleukin 4	Bersinger (2008)
HOXA10	Homeobox A10	Aghajanova (2008)b	IL10	Interleukin 10	Otsuka (2007)
SGK1	Serum/glucocorticoid regulated kinase 1	Feroze-Zaidi (2007)	IL11	Interleukin 11	Karpovich (2005)
LEP	Leptin	Labarta (2011)	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	Catalano (2005)
PGR	Progesterone receptor	Palomino (2005)	CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma stimulating activity, alpha)	Hess (2007)
PRDX1	Peroxiredoxin 1	Aghajanova (2008)b	PTGFR	Prostaglandin receptor (FP)	F Catalano (2011)
CLIC1	Chloride intracellular channel 1	Chen (2009)	FOXP3	Forkhead box P3	Jasper (2006)
AREG	Amphiregulin	Barnea	IL18	Interleukin 18	Ledee-

SG	Nombre del gen	Referencia	SG	Nombre del gen	Referencia
		(2012)		(interferon-gamma-inducing factor)	Bataille (2005)
ARHGDI1	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	Chen (2009)	IL21	Interleukin 21	Altmäe (2010)
PGRMC1	Progesterone receptor membrane component 1	Chen (2009)	PLA2G4A	Phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	Achache, (2010)
EZR	Ezrin	Chen (2009)	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	Aghajanova (2008)b
STMN1	Stathmin 1	Dominguez (2009)	PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	Aghajanova (2008)b
ANXA2	Annexin A2	Dominguez (2009)	IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I	Bourdiec (2012)
CALR	Calreticulin	Parmar (2009)	TNF	Tumor necrosis factor	Chobotova (2005)
SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin), member 1	Parmar (2009)	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	Skrzypczak (2007)
PRDX2	Peroxiredoxin 2	Aghajanova (2008)b	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	Skrzypczak (2007)
MUC4	Mucin 4, cell surface associated	Aghajanova (2008)b	SELL	Selectin L	Lai (2005)
MUC1	Mucin 1, cell surface associated	Horne (2005)	C2CD4B	C2 calcium-dependent domain containing 4B	Haouzi (2009)
S100P	S100 calcium binding protein P	Otsuka (2007)	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	Skrzypczak (2007)
IL5	Interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)	Teklenburg (2010)	EGF	Epidermal growth factor	Chobotova (2005)
FZD5	Frizzled family receptor 5	Krikun (2005)	FGF7	Fibroblast growth factor 7	Altmae (2012)

SG	Nombre del gen	Referencia	SG	Nombre del gen	Referencia
CXCL14	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	Mokhtar (2010)	CRHR2	Corticotropin releasing hormone receptor 2	Zoumakis (2009)
PAEP	Progestagen-associated endometrial protein	Stavreus-Evers (2006)	LIFR	Leukemia inhibitory factor receptor alpha	Stavreus-Evers (2006)
HPSE	Heparanase	Xu (2007)	CYC1	Cytochrome c-1	Sadek (2012)
DKK1	Dickkopf signaling pathway inhibitor 1	Macklon (2008)	SDHA	Succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	Vestergaard (2011)
ANXA4	Annexin A4	Ponnampalam and Rogers, (2006)	TOP1	Topoisomerase (DNA) I	Sadek (2012)
MUC16	Mucin 16, cell surface associated	Gipson (2008)	ACTB	Actin, beta	Vestergaard (2011)
MMP26	Matrix metalloproteinase 26	Pilka (2006)	RPL13A	Ribosomal protein L13a	Vestergaard (2011)
MT1G	Metallothionein 1G	Díaz-Gimeno (2011)	YWHAZ	Tyrosine monooxygenase/tryptophan monooxygenase activation protein, zeta	Vestergaard (2011)
AQP3	Aquaporin 3 (Gill blood group)	Díaz-Gimeno (2011)	ATP5B	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial complex, polypeptide F1 beta	Sadek (2012)
SERPINC1	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	Díaz-Gimeno (2011)	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Vestergaard (2011)
CTNNA2	Catenin (cadherin-associated protein), alpha 2	Altmäe (2010)	HMBS	Hydroxymethylbilane synthase	Vestergaard (2011)
CAPN6	Calpain 6	Altmäe (2010)	EMG1	EMG1 N1-specific pseudouridine methyltransferase	Vestergaard (2011)
IGFBP1	Insulin-like growth factor binding protein 1	Fluhr (2006)	TBP	TATA box binding protein	Vestergaard (2011)
MAOA	Monoamine oxidase A	Díaz-Gimeno (2011)	MT1L	Metallothionein 1L	Ruiz-Alonso (2012)
GPX3	Glutathione	Horcajadas	MT1X	Metallothionein 1X	Ruiz-



SG	Nombre del gen	Referencia	SG	Nombre del gen	Referencia
	peroxidase (plasma) 3	(2008)			Alonso (2012)
MT2A	Metallothionein 2A	Díaz-Gimeno (2011)	IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3	Horcajadas (2008)
ID4	Inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	Díaz-Gimeno (2011)	APOD	Apolipoprotein D	Haouzi (2009)
S100A1	S100 calcium binding protein A1	Otsuka (2007)	APOE	Apolipoprotein E	Allegra (2012)
AMIGO2	Adhesion molecule with Ig-like domain 2	Díaz-Gimeno (2011)	CLDN4	Claudin 4	Haouzi (2009)
PLA2G16	Phospholipase A2, group XVI	Díaz-Gimeno (2011)	FOXO1	Forkhead box O1	Grinius (2006)
GABARA PL1	GABA(A) receptor-associated protein like 1	Díaz-Gimeno (2011)	CIR1	Corepressor interacting with RBPJ, 1	Ruíz-Alonso (2012)
C4BPA	Complement component 4 binding protein, alpha	Tapia (2011)	ACTA1	Actin, alpha 1, skeletal muscle	Altmäe (2010)
TSPAN8	Tetraspanin 8	Díaz-Gimeno (2011)	TFF3	Trefoil factor 3 (intestinal)	Casado-Vela (2009)
SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	Díaz-Gimeno (2011)	PRKCG	Protein kinase C, gamma	Altmäe (2010)
NNMT	Nicotinamide N-methyltransferase	Allegra (2009)	STC1	Stanniocalcin 1	Allegra (2009)
SCGB2A2	Secretoglobin, family 2A, member 2	Díaz-Gimeno (2011)	HBA1	Hemoglobin, alpha 1	Altmäe (2010)
LYPD3	LY6/PLAUR domain containing 3	Díaz-Gimeno (2011)	HBG1	Hemoglobin, gamma A	Altmäe (2010)
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	Grewal (2008)	MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	Barnea (2012)
C10ORF10	Chromosome 10 open reading frame 10	Watanabe (2005)	CALCA	Calcitonin-related polypeptide alpha	Otsuka (2007)

SG	Nombre del gen	Referencia	SG	Nombre del gen	Referencia
HOXA11	Homeobox A11	Lynch (2009)	ITGAV	Integrin, alpha V	Zhao (2010=

**Tabla II. Listado de los 192 genes relacionados con la WOI.** Se indica el símbolo del gen (SG), el nombre y la primera referencia encontrada en Pubmed relacionada con la receptividad endometrial o el proceso de implantación embrionaria. Los genes constitutivos se encuentran remarcados en negrita.

## 7.4. Ontología génica e interacciones proteicas

Para investigar la ontología génica de los 192 genes WOI se utilizaron los recursos bioinformáticos DAVID (anexo VI), disponibles *online*. Se examinaron minuciosamente los procesos biológicos, los componentes celulares y las funciones moleculares. Algunos procesos biológicos que se encontraron sobre-representados estaban relacionados principalmente con la proliferación celular, respuesta a lesión, respuesta defensiva, regulación positiva de los procesos del sistema inmunitario y regulación negativa de transporte (tabla III). Los principales componentes celulares y las principales funciones moleculares se encuentran reflejados también en la tabla III. Cabe destacar la presencia de componentes extracelulares y las funciones moleculares relacionadas con las citoquinas. Además, algunas rutas KEGG se encontraron también sobre-representadas con relevancia estadística asociadas a interacciones de receptores citoquina-citoquina, rutas en cáncer o rutas de señalización de receptores tipo NOD (datos no mostrados).

Categoría	Término	Genes	%	p-valor
<b>PB</b>	Regulación de proliferación celular	47	24,6	9,0 E-19
<b>PB</b>	Regulación positive de proliferación celular	33	17,3	1,6 E-16
<b>PB</b>	Respuesta a heridas	35	18,3	5,1 E-15
<b>PB</b>	Respuesta defensiva	36	18,8	6,8 E-14
<b>PB</b>	Regulación positive de procesos del Sistema inmunitario	23	12,0	3,9 E-13
<b>PB</b>	Regulación negative de transporte	18	9,4	1,4 E-12
<b>FM</b>	Actividad de citoquinas	30	15,7	3,7 E-23
<b>FM</b>	Actividad de factor de crecimiento	23	12,0	6,0 E-17
<b>FM</b>	Fijación a iones de cadmio	5	2,6	4,9 E-6
<b>FM</b>	Actividad antioxidante	7	3,7	2,6 E-5
<b>CC</b>	Región extracelular	65	34	6,3 E-30
<b>CC</b>	Espacio extracelular	55	28,8	2,0 E-28

**Tabla III. Gene Ontology (GO) de los 192 genes de seleccionados.** PB=proceso biológico, FM=Función molecular y CC=Componente celular. Se indica el número y el porcentaje de genes pertenecientes a cada categoría así como el p-valor.

Los 192 genes WOI fueron analizados por la herramienta *online STRING* para interrogar acerca de las interacciones entre dichos genes. Se encontraron un total de 242 interacciones proteína-proteína, cuando lo esperado en el análisis del complejo era de 103 (figura 16), con un coeficiente de agrupación de 0,346. Esto significa que nuestro grupo de proteínas tiene más interacciones entre ellas de las esperadas de un grupo con tamaño similar de proteínas aleatorias a partir del genoma. Tal enriquecimiento indica que estas proteínas están conectadas biológicamente como grupo (figura 16).

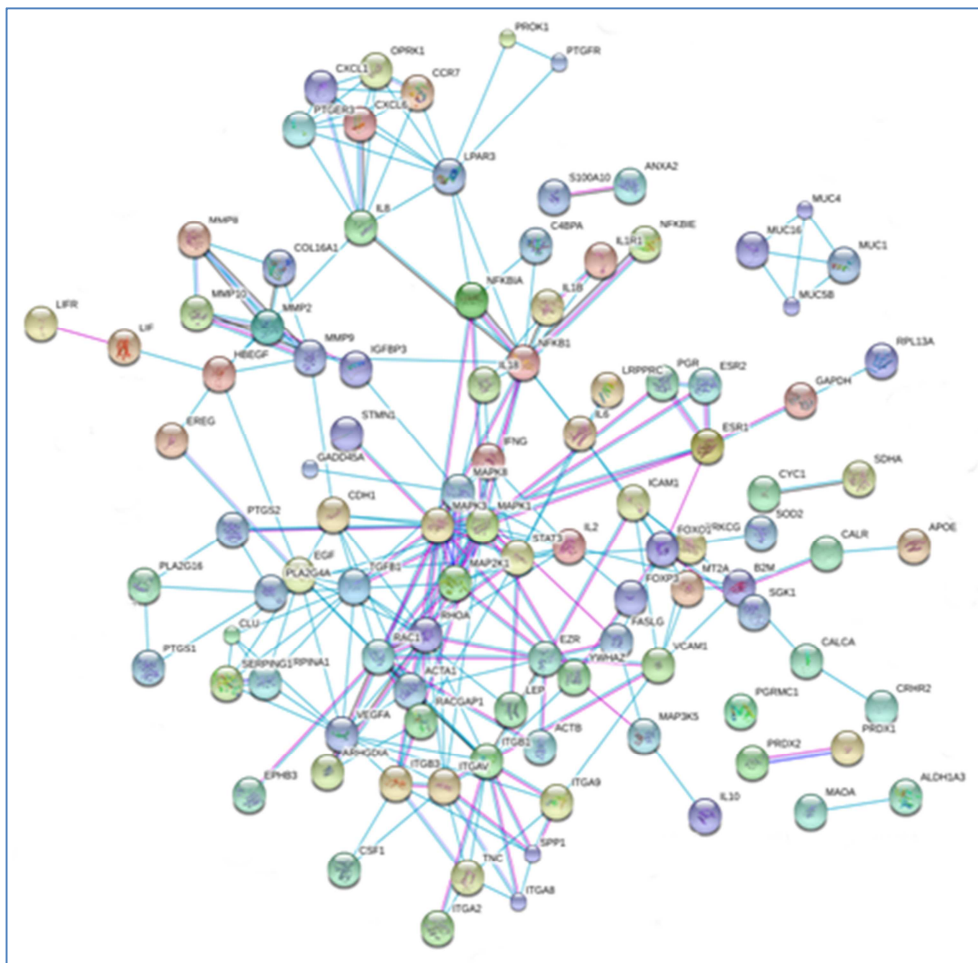


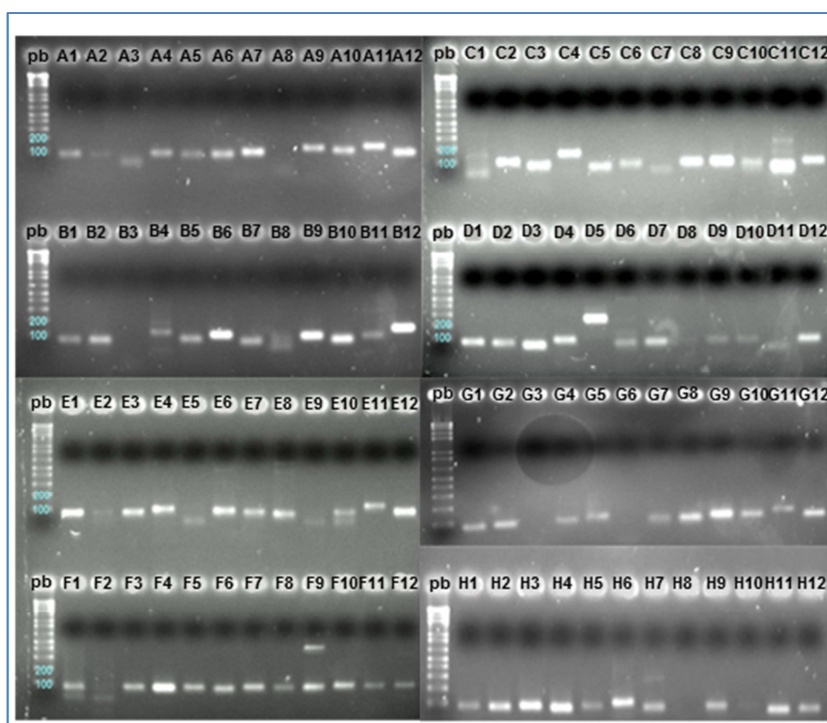
Figura 16. Mapa de interacción protéica de los 192 genes seleccionados.\*

## 7.5. Selección y validación de las parejas de oligonucleótidos para los 192 genes WOI

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para los 192 genes WOI pueden consultarse en el anexo III. Todos los pares de oligonucleótidos fueron seleccionados para generar un producto de PCR de entre 60-150 pb cubriendo más de un exón (anexo IV).

\*190 proteínas identificadas, MT1L y EMG1 no se encontraron en homo sapiens.

Los oligonucleótidos fueron validados mediante PCR convencional para confirmar su correcto funcionamiento. Fue necesaria una media de 2,4 pruebas por pareja de oligonucleótidos para validarlos, ya que la temperatura óptima calculada no fue la adecuada en muchos de los ensayos. En estos casos, lo primero que se realizó fue modificar la temperatura de hibridación y si no funcionaba se subían los ciclos de 40 a 45-50 ciclos, y la concentración de oligonucleótidos de 0,5µl a 1µl. Tras los numerosos ensayos de PCRs, y electroforesis del producto de éstas, se obtuvo un alto porcentaje de oligonucleótidos validados, 88,5% (figura 17). El resto de parejas de oligonucleótidos (11,5%) no pudieron ser validados con la variación de las condiciones de PCR y pasaron a ser diseñados manualmente con el programa *Gene Fisher 2*. El programa reportó varias opciones de oligonucleótidos *forward* y *reverse* con un producto de PCR de entre 150-200 pb cubriendo más de un exón. Se seleccionó de cada uno, aquella opción que mayor nivel de calidad presentaba, esto es, la cifra más alta de *quality score* (anexo V).



**Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los oligonucleótidos seleccionados para los genes de la WO1.** Algunos oligonucleótidos como A8, B3, C11, D5, F9 o H8 no funcionaron correctamente.

A través de la herramienta *Blast* se comprobó las secuencias con sus homólogas, para comprobar que las hibridaciones eran específicas. Para ello, se evaluó los valores de puntuación (*score*), de p-valor (*p-value*), e-valor (*e-value*: número de hibridaciones de una puntuación determinada que podrían ocurrir por puro azar en una base de datos de igual longitud), identidad (porcentaje de posiciones idénticas) y similitud (porcentaje de posiciones similares). El resultado de la comparación de las secuencias de los oligonucleótidos fue del 100% en todos los casos.

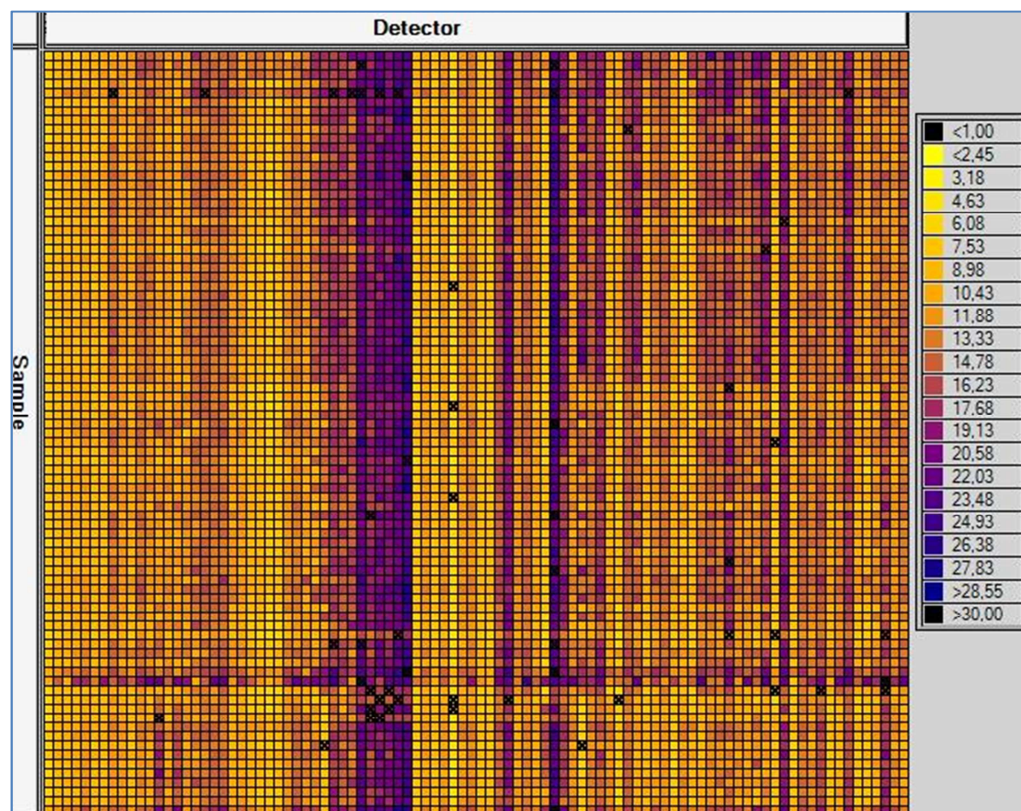
## 7.6. Análisis de calidad de qPCR en microfluidos

La calidad de los resultados transcriptómicos de los experimentos con *Biomark HD* de *Fluidigm* fueron analizados a través del *software Fluidigm Real Time PCR Analysis*. Cada reacción de qPCR presenta unos valores de marca de calidad de la curva de amplificación que analizados por este *software*, clasifica como aptos o no aptos (*pass*=apto o *fail*=no apto). Además, si la curva y los parámetros de amplificación no superan un mínimo de calidad (>0,65), estos resultados son clasificados como no aptos.

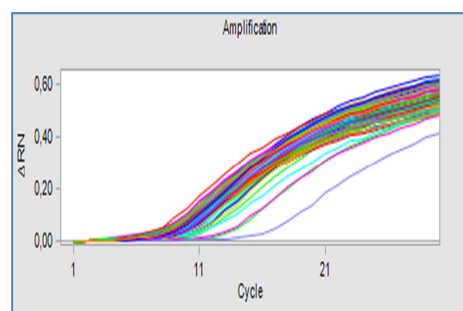
Los valores Ct de todas las reacciones llevadas a cabo pueden visualizarse en un *heat map*, observándose diferencias en la expresión génica en las diferentes muestras (figura 18A). Se comprobó también de manera visual que cada gen se amplificara de manera correcta a través de las curvas de amplificación (figura 18B). Las gráficas de las curvas de *melting*, además, presentaban un solo pico, lo que significa que se había amplificado un solo producto de PCR (figura 18C). En el caso de haber obtenido en algún gen más de un pico en las curvas de *melting* habría sido necesario rediseñarlo, ya que se estaría amplificando más de un producto o se estarían formando dímeros de los oligonucleótidos amplificándose éstos con posterioridad (el pico sería más pequeño y estaría unos 10°C por debajo de la curva de *melting* original).



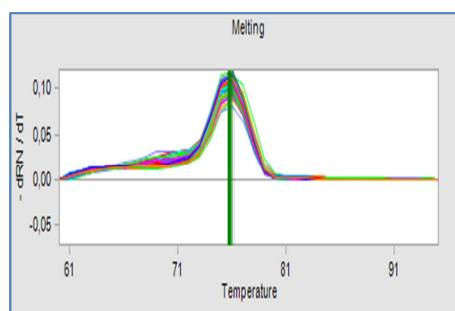
A



B



C



**Figura 18. Representaciones gráficas del programa de análisis Fluidigm Real Time PCR Analysis.** A) Heat map de Fluidigm en el que cada intersección representa una PCR cuantitativa individual de un gen para una muestra determinada. Los colores representan los valores Ct, como se indica en la leyenda. En la leyenda cada color viene representado por un valor Ct B) Curva de amplificación para un gen de los 192 estudiados. C) Gráfica de la curva de la temperatura de melting para uno de los genes estudia.

## 7.7. Efecto del cobre en genes de receptividad endometrial y de respuesta inmunológica

El proceso de decidualización indujo cambios en la mayor parte de los genes WOI. En total, 132 de los 184 genes estudiados, fueron sobre-expresados ( $n=75$ ) o reprimidos ( $n=57$ ) más de dos veces [*Fold Change* (FC)]  $>2,0$  ó  $FC < -2,0$ , con un rango de variación de  $FC=+41.598$  del gen IGFBP1 a los  $FC=-5.260$  del gen MMP26 (tabla IV). El efecto del cobre sobre estos mismos genes alteró la expresión de 129 (94 sobre-expresados y 35 reprimidos) mientras que el CPT afectó a 154 (91 sobre-expresados y 47 reprimidos), cuando fueron comparados con D0. Se compararon los resultados obtenidos del FC en D8, cobre y CPT, seleccionando aquellos genes que habían variado su expresión génica en al menos un orden de magnitud entre el FC de D8 y los grupos experimentales del cobre y del CPT, encontrándose resaltados en negrita en la tabla IV. El cobre alteró la expresión génica en al menos un orden de magnitud en 49 genes (42 sobre-expresados y 7 reprimidos), mientras que el efecto del CPT únicamente alteró a 31 de ellos (19 sobre-expresados y 12 reprimidos). En cualquier caso se observó una alteración de la expresión génica normal de las células decidualizadas con ambos tratamientos.

Símbolo gen	FC D8	FC cobre	FC CPT	Símbolo gen	FC D8	FC cobre	FC CPT
IGFBP1	4.5198,87	22.782,89	9.843,00	IL15	5,45	<b>-25,08</b>	<b>-2,41</b>
MMP10	26.971,94	5.188,83	16.294,53	PTGS2	5,31	2,47	13,77
TNFRSF11B	1.562,70	<b>116,42</b>	<b>103,26</b>	IGFBP3	5,30	2,83	9,88
STC1	611,19	314,28	430,25	CDA	5,06	6,82	20,61
SPP1	594,82	1.099,40	714,77	SOD2	4,65	4,21	4,05
GDF15	320,87	138,19	<b>3.394,83</b>	CXCL1	4,61	21,53	4,26
EREG	281,68	307,28	352,99	FASLG	4,37	11,21	16,30
GPX3	229,59	280,20	438,32	IL5	4,22	<b>76,45</b>	14,80
IL8	76,70	<b>2.548,33</b>	89,02	GADD45A	4,14	<b>98,88</b>	<b>70,97</b>
NNMT	60,96	11,53	15,49	TFF3	4,07	9,19	16,25
IER3	59,15	43,54	78,05	IL2	3,80	25,94	<b>-3,24</b>
CLU	54,18	55,60	79,85	AMIGO2	3,47	<b>-2,62</b>	8,26



Símbolo gen	FC D8	FC cobre	FC CPT	Símbolo gen	FC D8	FC cobre	FC CPT
MT2A	52,44	63,15	19,83	CALR	3,41	3,43	4,36
AREG	50,12	91,44	<b>517,30</b>	CD55	3,38	2,74	10,64
ITGB3	45,97	21,18	26,07	SGK1	3,01	5,08	7,73
CSF3	38,36	<b>2.258,27</b>	104,80	ID4	2,90	2,83	6,32
IL11	36,53	<b>886,38</b>	31,34	MT1G	2,83	<b>6.732,80</b>	12,08
MT1L	32,47	38,17	15,14	MAPK8	2,82	1,18	<b>-1,72</b>
CCR7	30,92	30,29	43,47	SERPING1	2,79	3,11	5,22
MAOA	28,28	19,28	<b>1,68</b>	HPSE	2,78	7,75	3,36
IL1B	28,11	10,41	8,32	TGFB1	2,70	3,09	3,56
DKK1	22,86	5,53	8,03	ACTA1	2,68	20,94	1,32
ABCC3	21,90	14,53	49,92	LYPD3	2,52	11,98	<b>66,07</b>
MT1H	20,09	38,94	14,09	S100A2	2,42	6,91	<b>30,79</b>
GNLY	18,65	19,20	11,77	CALCA	2,41	<b>42,45</b>	3,16
PTGS1	18,29	3,01	11,34	PRDX1	2,15	3,23	5,06
S100P	18,06	85,85	32,98	IFNG	2,04	4,04	16,58
HBEGF	18,01	14,13	165,75	CTNNA2	2,03	2,03	8,29
ICAM1	16,13	20,20	27,10	BTC	2,00	7,58	<b>-97,17</b>
VEGFA	14,75	5,57	6,65	MAP2K1	NC	<b>2.253,83</b>	1,61
GAST	12,99	<b>147,11</b>	115,47	CXCL6	NC	<b>327,95</b>	5,53
IL6	12,19	6,36	10,05	IL21	NC	<b>303,70</b>	8,89
MMP2	11,62	13,49	14,39	LEP	NC	<b>303,70</b>	7,64
C2CD4B	10,47	9,87	9,89	OPRK1	NC	<b>303,70</b>	6,76
TSPAN8	9,94	3,46	21,99	LIF	NC	<b>66,94</b>	<b>49,00</b>
ITGA2	9,42	4,08	3,92	MFAP5	NC	<b>51,78</b>	1,81
MAP3K5	8,93	1,52	<b>-4,06</b>	HOXA11	NC	<b>-24,69</b>	-1,97
PAEP	8,23	21,39	15,22	EGF	NC	9,10	13,35
IL1R1	7,94	<b>-1,54</b>	<b>-1,63</b>	IL4	NC	4,17	1,64
MT1X	7,84	<b>101,06</b>	8,86	CATSPERB	NC	4,05	3,12
MT1E	7,36	<b>85,36</b>	10,04	CRHR2	NC	4,04	16,58
DEFB1	6,57	20,08	31,15	LCP1	NC	2,68	-4,59
GABARAPL1	6,50	9,17	10,69	APOD	NC	2,14	3,37
FOXO1	6,39	<b>-1,18</b>	<b>-3,46</b>	ANXA2	NC	2,03	-1,38
CAPN6	5,74	3,44	3,01	CSF1	NC	NC	13,21
C10ORF10	5,56	3,51	1,31	NFKBIE	NC	NC	8,56
IL10	NC	NC	2,90	LIFR	-4,40	-31,19	-3,76
ATP5B	NC	NC	2,64	FOXP3	-4,42	-1,05	-1,65
ANXA4	NC	NC	2,47	HPRT	-4,42	-23,01	-4,23

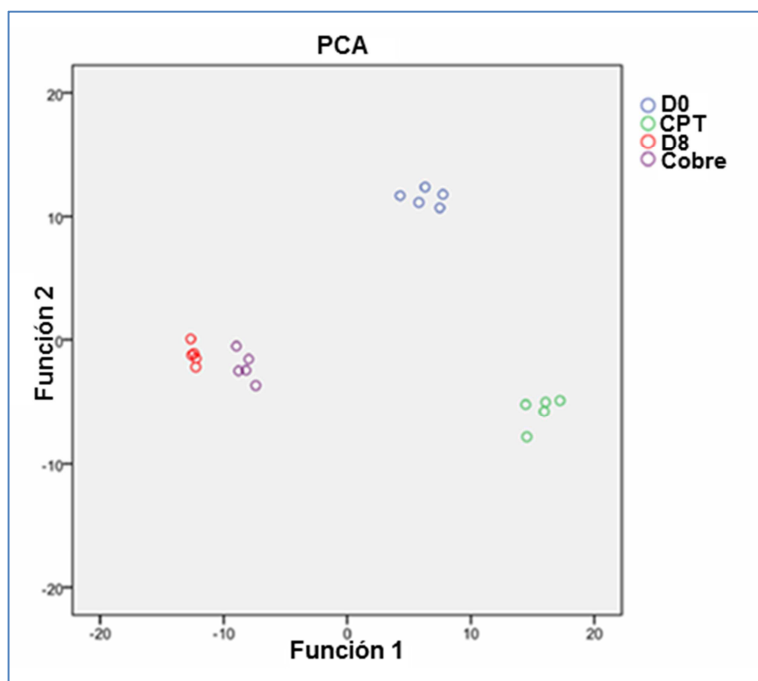
Símbolo gen	FC D8	FC cobre	FC CPT	Símbolo gen	FC D8	FC cobre	FC CPT
PGRMC1	NC	NC	2,10	AQP3	-4,62	<b>1,66</b>	<b>7,02</b>
ARG2	NC	NC	NC	HBG1	-4,72	<b>119,27</b>	<b>4,00</b>
ARHGDI A	NC	NC	NC	PLA2G16	-4,84	-2,00	-2,08
PRDX2	NC	NC	NC	C4BPA	-5,25	<b>4,92</b>	-7,05
CLIC1	NC	NC	NC	SELL	-5,57	<b>13,85</b>	-8,24
STAT3	NC	NC	NC	FGF7	-5,84	-4,88	-1,76
RAC1	NC	NC	NC	ANGPTL1	-5,91	<b>1,58</b>	-8,03
HMBS	NC	NC	NC	PLA2G4A	-5,98	-7,93	<b>-97,37</b>
ITGB1	NC	NC	NC	PTGER3	-6,01	-2,74	-2,94
CMTM5	NC	NC	NC	RACGAP1	-6,15	-1,18	-3,00
GJA4	NC	NC	NC	HOXB7	-6,26	-58,46	-3,38
PTPRZ1	NC	NC	NC	MUC4	-6,49	NC	NC
SCGB2A2	NC	NC	NC	COL16A1	-6,80	-4,17	<b>1,63</b>
SCGB3A1	NC	NC	NC	FAM3B	-6,96	NC	-30,38
RHOA	NC	NC	NC	WISP2	-6,99	<b>4,61</b>	<b>2,52</b>
PROK1	NC	NC	NC	ESR2	-7,54	<b>1,55</b>	-5,95
VCAM1	NC	NC	NC	MUC5B	-8,11	NC	-36,55
CDH1	NC	NC	NC	ESR1	-8,93	-18,79	-36,58
CIR1	NC	NC	NC	IL18	-9,45	<b>7,22</b>	-45,00
MMP9	NC	NC	NC	PRKCG	-9,69	NC	<b>6,34</b>
MMP8	NC	NC	NC	CXCL14	-10,60	<b>2,77</b>	-15,48
MAPK3	NC	NC	-4,06	CRISP3	-12,01	<b>34,39</b>	-25,42
SERPINA1	NC	NC	<b>-5.194,56</b>	ALDH1A3	-12,39	-4,05	-4,04
LRPPRC	NC	-2,16	NC	TNC	-13,14	-22,42	-5,01
NFKB1	NC	-2,17	NC	TNF	-14,53	<b>6,28</b>	<b>2,22</b>
PTGFR	NC	-2,21	2,65	ITGA8	-14,99	-13,31	-4,86
STMN1	NC	-2,37	NC	FAM3D	-15,57	NC	NC
SDHA	NC	-2,67	NC	CLDN4	-19,37	<b>-1,07</b>	<b>2,26</b>
TAGLN2	NC	-2,92	3,46	CCL2	-20,27	-4,42	-26,81
MAPK1	NC	-3,49	NC	APOL2	-24,58	-23,87	<b>-1,28</b>
ITGAV	NC	-5,29	NC	FZD5	-29,13	-3,11	-3,45
NFKBIA	NC	-7,00	NC	MUC16	-42,08	<b>NC</b>	<b>NC</b>
EZR	-2,11	-1,22	1,22	PPP2R2C	-53,17	<b>1,46</b>	-50,86
RPL13A	-2,51	-1,94	-2,85	S100A1	-54,93	<b>4,90</b>	-19,18
HOXA10	-2,56	-8,17	-4,30	MUC1	-78,31	-126,53	-240,45
CSRP2	-2,58	<b>1,05</b>	<b>1,22</b>	LRRC17	-87,70	<b>NC</b>	-18,22
PGR	-2,95	<b>-165,45</b>	-20,48	LPAR3	-117,23	-120,50	-39,05

Símbolo gen	FC D8	FC cobre	FC CPT	Símbolo gen	FC D8	FC cobre	FC CPT
EPHB3	-2,95	-1,27	<b>4,58</b>	ITGA9	-209,92	<b>NC</b>	<b>-191,79</b>
FUT4	-2,97	<b>10,76</b>	<b>2,00</b>	KCNG1	-509,07	<b>-1,43</b>	<b>-71,28</b>
S100A10	-3,50	-18,40	<b>4,75</b>	SPDEF	-611,49	<b>NC</b>	<b>-322,26</b>
APOE	-3,94	-3,09	-1,37	SLPI	-677,70	<b>-23,14</b>	<b>-479,64</b>
IDH1	-4,19	-1,53	-3,78	HBA1	-	<b>-14,28</b>	-
					4.472,1		1.401,7
MT1F	-4,38	<b>378,33</b>	<b>211,29</b>	MMP26	-	<b>-10,03</b>	-
					5.260,7		1.087,4

Tabla IV. Fold Change (FC) de los 192 genes de la WOI para el grupo dHESC en día 8 (D8), y los tratamientos con cobre y CPT tomando como control D0. Se encuentran resaltados en negrita aquellos genes cuya diferencia del FC entre D8 y cobre o CPT es mayor a un orden de magnitud. Sin cambios (No changes=NC) con  $-2 > FC < 2$ .

## 7.8. Análisis de componentes principales (PCA)

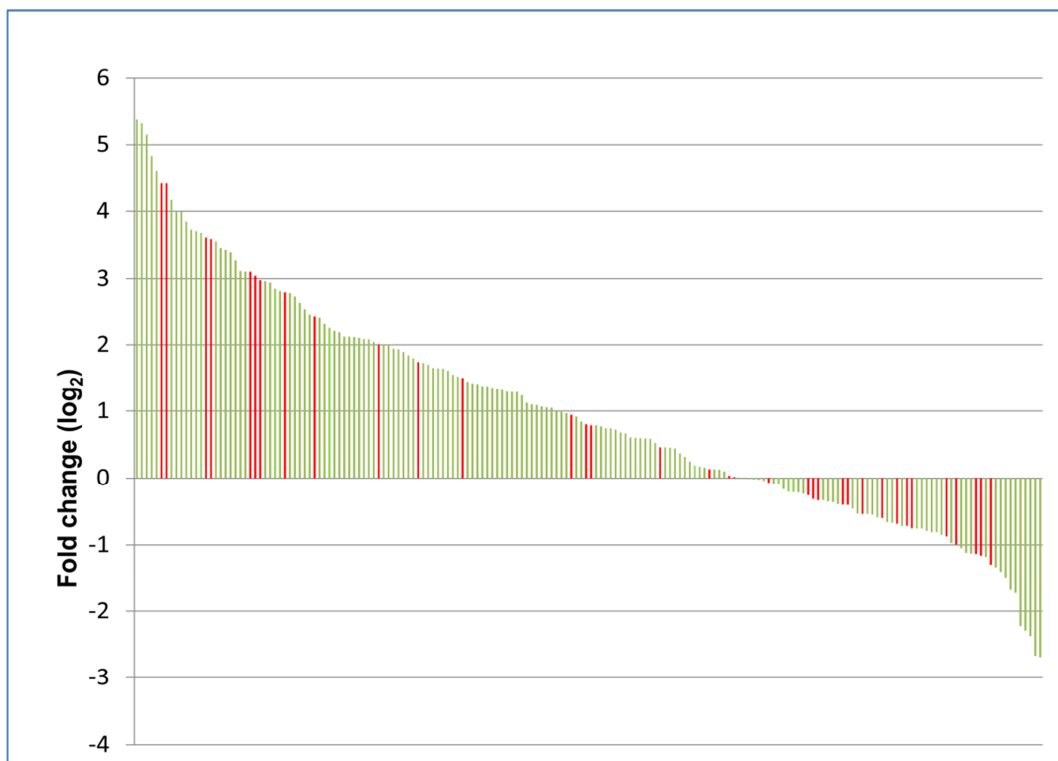
Los resultados del PCA revelaron cuatro *clusters* distintos que se correspondían con los cuatro grupos experimentales diferentes (HESC en día 0, dHESC en día 8, dHESC en día 8 con cobre y dHESC en día 8 con CPT) (figura 19). Estos *clusters* se encuentran separados en áreas distintas en la visualización bi-dimensional, indicando una clara diferencia en la expresión génica global de los genes WOI.



**Figura 19. Clasificación PCA basada en los datos de expresión génica de los 192 genes de la WOI.** El grupo D0 (células no decidualizadas) es representado como círculos azules, el grupo D8 (células decidualizadas) como círculos rojos, el grupo de cobre (células decidualizadas con cobre) como círculos morados y el grupo de CPT (células decidualizadas con CPT) como círculos verdes.

## 7.9. Diferencias en expresión génica de los 192 genes WOI en ciclo natural

Se analizaron los 192 genes WOI en mujeres en ciclo natural, utilizando 16 biopsias endometriales 2 y 7 días después del pico de LH endógena (LH+2 y LH+7). Se calculó el *fold change* (FC) entre las biopsias endometriales en LH+7 y LH+2, observándose diferencias en los patrones de expresión génica entre muestras receptivas y no receptivas, como era esperado. La mayoría de los genes (124) están sobre-expresados durante la ventana de implantación, LH+7, en comparación con la muestra de referencia, LH+2. Existen diferencias significativas con un  $\log_2 FC > 1,0$  o un  $\log_2 FC < -1,0$  en 102 genes entre la fase secretora LH+7 y la fase proliferativa LH+2, estando 85 sobre-expresados y 17 reprimidos (figura 20).



**Figura 20. Diferencias de expresión de los 192 genes de la WOI en donantes fértiles en estadio receptivo (LH+7) y estadio no receptivo (LH+2).** Gráfico de barras mostrando las diferencias de Fold Change en log2 de los genes de la WOI en LH+7 y LH+2. Están diferencialmente sobre-expresados ( $\log_2$  fold change  $> 1$ ) 85 mRNA y 17 están reprimidos ( $\log_2$  fold change). Se encuentran marcados en rojo los 35 genes seleccionados para el clasificador de muestras endometriales.

### 7.10. Diferencias en la expresión de los genes WOI en ciclos naturales y sustituidos

Se realizó la media geométrica de los 8 genes constitutivos y se normalizó los valores Ct de todos los genes de las muestras de donantes fértiles y pacientes subfértiles de las muestras no receptivas, pre-receptivas, receptivas y post-receptivas. Al analizar genes de manera individual se pueden observar pequeñas diferencias entre los diferentes estadios de receptividad endometrial, así como entre estadios receptivos de ciclos naturales y ciclos sustituidos. En la figura 21 se representan los datos de 4 genes de los 192 para mostrar, de una manera visual, los cambios de expresión génica en las distintas fases de ambos

tipos de ciclos. Esto permite clasificar una muestra en los diferentes grupos de receptividad endometrial según los datos de expresión génica.

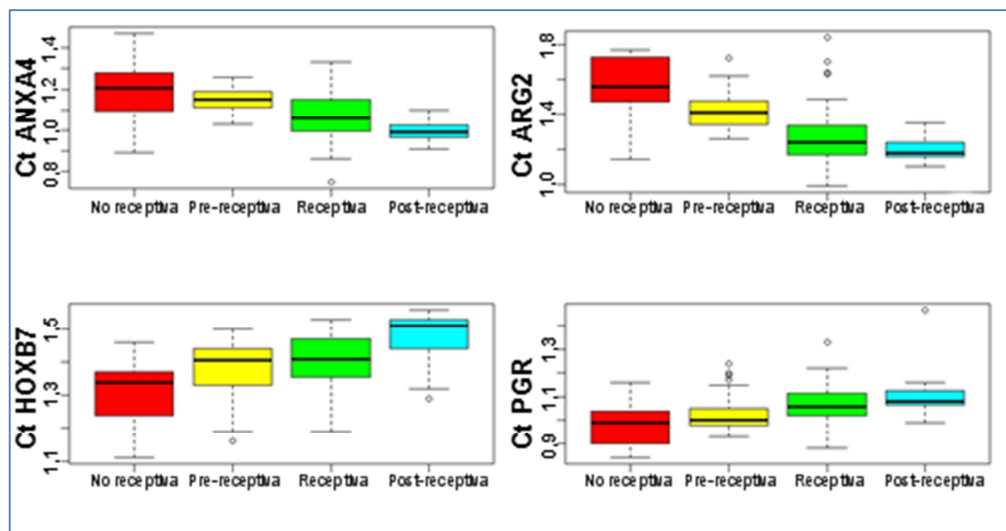


Figura 21. Representación gráfica de 4 genes de la WOI (ANXA2, ARG2, HOXB7 y PGR) de sus datos de expresión génica en muestras no receptivas, pre-receptivas, receptivas y post-receptivas.

## 7.11. Selección de genes para la elaboración de una herramienta molecular para la evaluación de la receptividad endometrial

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con los datos de 138 biopsias endometriales con diferentes estadios de receptividad endometrial: no receptiva, pre-receptivas, receptivas, post-receptivas. Como resultado de este análisis se extrajeron 16 componentes principales que eran capaces de explicar el 93,47% de la varianza total de las muestras (figura 22). Como en todos los PCA, el primer componente es el que es capaz de explicar por sí sólo la mayor varianza total de las muestras, reduciéndose en las siguientes dimensiones ya que estas explican la varianza restante. En nuestro caso, el primer componente es capaz de explicar hasta el 40% de la varianza total, el segundo componente

un 12%, reduciéndose paulatinamente con la sucesión de los componentes hasta un 1% del componente 16 (figura 22).

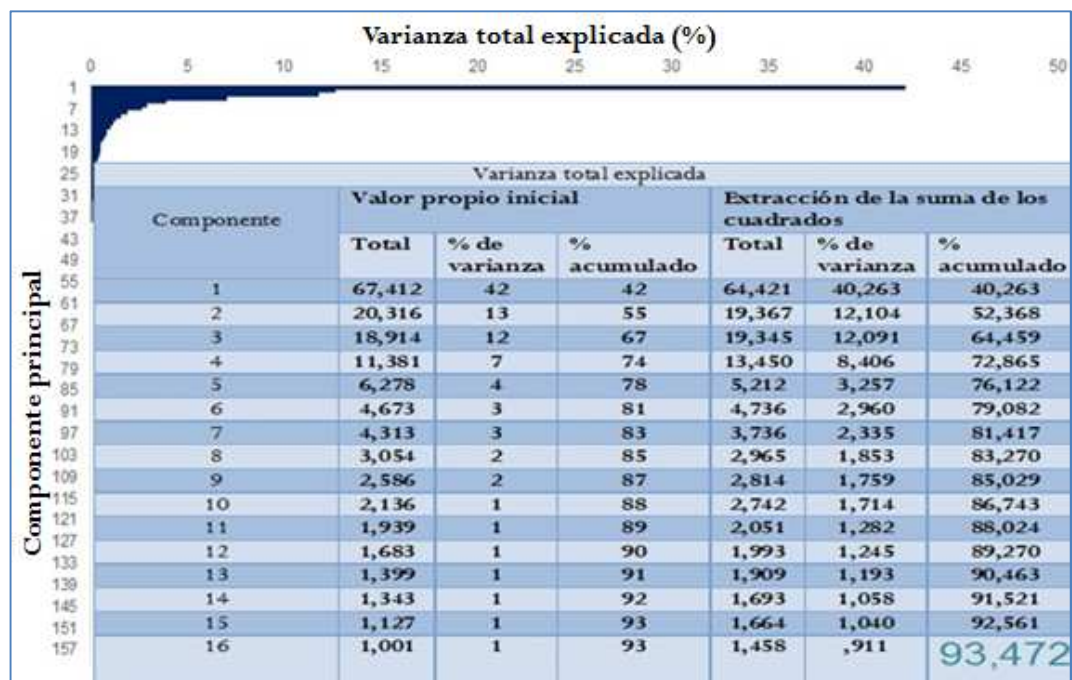


Figura 22. Scree test mostrando la varianza total explicada (valores propios, eje Y) para los componentes sucesivos (eje X). Se indica el porcentaje de la varianza total explicada para los 16 componentes principales, el porcentaje de varianza de cada componente (representado en orden de mayor a menor) y el porcentaje acumulado se encuentra también indicado.

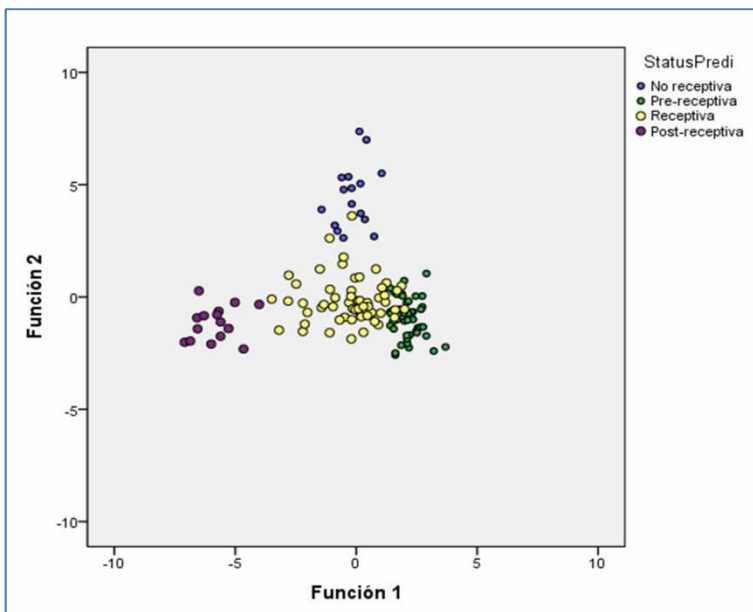
Se seleccionaron los 35 genes más importantes en la matriz de los componentes principales (mayor correlación entre el gen y el componente principal) siempre que se expresaran correctamente en la mayoría de las muestras analizadas. Los genes seleccionados fueron utilizados para la agrupación de las muestras.

## 7.12. Análisis de agrupación de muestras según clasificación de estadio de receptividad endometrial

Este análisis permitía a través de los 35 genes seleccionados clasificar de manera precisa el estadio de receptividad endometrial de las biopsias

endometriales obtenidas tanto de donantes fértiles cómo de pacientes subfértiles. Los 35 genes de receptividad endometrial permitieron una clasificación precisa y correcta de las muestras en cuatro estadios de receptividad endometrial: no-receptiva, pre-receptiva, receptiva y post-receptiva en ambos grupos, mujeres fértiles y pacientes subfértiles (figura 23). Se compararon los resultados obtenidos entre nuestra herramienta de diagnóstico de receptividad endometrial y el ERA, coincidiendo en la clasificación del estadio endometrial en el 96,4% de los casos (tabla V). En el grupo de donantes fértiles, el 100% de las muestras en LH+2 fueron clasificadas como no receptivas, mientras que todas las muestras en LH+7 se clasificaron como receptivas excepto dos, siendo una clasificada como no receptiva y otra como pre-receptiva. En el grupo de las pacientes subfértiles, la clasificación de nuestra herramienta de receptividad endometrial coincidió con el ERA en el estadio de receptividad endometrial en el 98,6% de las muestras. Sólo dos muestras fueron clasificadas de manera diferente al ERA por la nueva herramienta de receptividad endometrial. Estas muestras se agruparon cómo pre-receptivas por nuestro sistema de receptividad endometrial mientras que fue clasificada como receptiva por el ERA (tabla V).





**Figura 23. Clasificación de biopsias endometriales de donantes fértiles y pacientes subfértiles basada en los datos de expresión génica de los 192 genes de la WOI.** El grupo no receptiva es representado como círculos azules, el grupo pre-receptiva como círculos verdes, el grupo de receptiva como círculos amarillos y el grupo de post-receptiva como círculos morados.

GRUPO ORIGINAL		N	GRUPO PREDICHO (%) <sup>a,b</sup>			
			No receptiva	Pre-receptiva	Receptiva	Post-receptiva
<b>DONANTES</b>	LH+2	16	93,75	0,00	6,25	0,00
	LH+7	16	6,25	6,25	87,5	-
<b>PACIENTES (P+5)</b>	Pre-receptiva	52	0,00	100,0	0,00	0,00
	Receptiva	39	0,00	5,1	94,9	0,00
	Post-receptiva	15	0,00	0,00	0,00	100,0

**Tabla V. Resultados de clasificación del análisis de función discriminante.** Tabla resumen de los resultados de clasificación del análisis de función discriminante de las donantes fértiles y de las pacientes sub-fértiles en los diferentes estadios de receptividad endometrial. Utilizando un modelo discriminante basado en los 35 genes seleccionados para la herramienta endometrial, se clasificaron correctamente el 93,75% de las muestras de donantes y el 97,8% de las muestras de pacientes sub-fértiles.

### 7.13. Diferencias en expresión génica de los 192 genes WOI en biopsias líquidas

De los 8 genes constitutivos analizados sólo el RNAm de TOP1 estaba presente en todas las muestras de orina, plasma y suero, mientras que el resto de genes constitutivos no se expresaban de forma regular expresándose sólo en algunas muestras. Al analizar los resultados de expresión génica de los 184 genes WOI se comprobó que sólo tres de ellos se expresaban en todas las muestras (CLU, FUT4 y IL2), mientras que en las muestras de suero siempre estaba presente el gen de la IL11, y en las muestras de orina los genes ANXA2, MT1E, MT1L, RHOA y RPL13A (tabla VI). Al normalizar estos genes con el gen constitutivo TOP1 no se pudo construir ningún predictor que diferenciara con exactitud las muestras LH+2 de las LH+7 debido a los pocos datos obtenidos y a la escasa variabilidad que mostraban.

Genes	Orina	S uero	Plasma
TOP1	+	+	+
CLU	+	+	+
FUT4	+	+	+
IL2	+	+	+
IL11	-	+	-
ANXA2	+	-	-
MT1E	+	-	-
MT1L	+	-	-
RHOA	+	-	-
RPL13A	+	-	-

**Tabla VI. mRNA contenido en los exosomas de orina, suero y plasma.** Se muestran aquellos genes cuya expresión en los exosomas de orina, suero o plasma pudieron ser detectados por el sistema Biomark HD de Fluidigm. Los genes que no se encuentran en esta tabla no se expresaron o sólo se detectó una débil expresión en alguna de las muestras. Se marca con el símbolo + si se encontró expresión de ese gen en todas las muestras de orina, suero o plasma, así cómo – si en alguna de las muestras no se encontró expresión de ese gen.

## 8. DISCUSIÓN



El método anticonceptivo más utilizado en el mundo son los dispositivos intrauterinos (DIU). Existen diferentes tipos de DIU como son los DIU inertes, los DIU de cobre y los DIU con liberación de hormonas. Los DIU de cobre tienen una mayor efectividad que los DIU inertes debido a la liberación de iones de cobre. El nivel medio de cobre en las usuarias del modelo de DIU de cobre TCu380A (Paragard) varía a lo largo del ciclo menstrual, siendo de  $85\mu\text{M}$  durante la fase proliferativa, de  $163\mu\text{M}$  durante la fase secretora y de  $198\mu\text{M}$  durante la menstruación, presentando una menor cantidad de cobre las mujeres no portadoras de DIU de cobre,  $1,26\mu\text{M}$  (Arancibia y cols., 2003). Durante la fase secretora el endometrio se encuentra bajo la influencia de hormonas esteroideas y de secreciones paracrinas esenciales para poder alcanzar un estadio receptivo, requisito indispensable para que se produzca la implantación embrionaria. Durante la preparación del endometrio para la implantación se produce un proceso de diferenciación de las células estromales conocido como decidualización. En ella los fibroblastos en división se especializan en células secretoras que producen los factores necesarios para ayudar al endometrio a alcanzar el estadio receptivo (Gellersen y Brosens, 2014).

**El primer objetivo** de este estudio era demostrar que el proceso de decidualización in vitro tiene un gran impacto en los niveles de apoptosis y necrosis celular en células endometriales estromales en cultivo. El resultado fue que las células HESC en cultivo in vitro mostraron unos niveles de vitalidad de cerca de un 80%, viéndose disminuida a menos de un 40% tras el tratamiento de decidualización (figura 14). Los efectos de la decidualización in vitro a nivel de apoptosis se vieron parcialmente disminuidos en el grupo con el tratamiento con cobre (con más del 50% de las células vivas), mientras que se encontraban aumentados en el tratamiento con CPT, donde menos del 16% de las células estaban vivas (figura 14). Los resultados obtenidos demostraron que el cobre no tiene efectos apoptóticos añadidos en las dHESC en cultivos celulares, al menos en tratamientos con una duración de 48 h. De hecho, parece tener un efecto protector, en cierta medida, sugiriendo un uso seguro de los niveles de cobre utilizados en los DIU. Por otro lado, el CPT, un inhibidor de la DNA

topoisomerasa I, utilizado de manera rutinaria en cultivos in vitro para inducir la apoptosis celular dependiendo de dosis, tuvo los resultados apoptóticos esperados, aumentando los niveles hasta un 65%.

Estudios previos realizados in vitro muestran los efectos apoptóticos de la deciduización a través del análisis de genes o proteínas relacionados con la apoptosis celular en células inmortalizadas (Boeddeker y cols., 2015), en modelos animales (Moulton, 1994) y en biopsias endometriales (Shikone y cols., 1997). Se ha comprobado que estos eventos apoptóticos son el resultado de la acción de factores solubles segregados por las propias células deciduizadas, siendo el AMPc empleado en el tratamiento, necesario tanto para la apoptosis como para la deciduización (Leno-Duran y cols., 2014). Las diferencias en los niveles de apoptosis entre ese estudio y el presente pueden deberse a pequeñas diferencias en el diseño experimental, y al tipo y dosis de los compuestos inductores de la deciduización.

**El segundo objetivo** de este trabajo consistía en analizar si la distribución celular de la actina y la tubulina se encontraba modificada durante la apoptosis celular formando el *apoptotic microtubule network (AMN)*. Estudios previos habían demostrado que durante la fase de ejecución de la apoptosis celular las células redistribuyen sus microtúbulos para mantener la configuración celular y la integridad de la membrana plasmática, evitando de esta manera la liberación de moléculas perjudiciales que podrían provocar inflamación y necrosis en las células vecinas (Savill y cols., 2002). Esta AMN está constituida por tubulina que se encuentra asociada a la membrana plasmática para evitar la acción de las caspasas. En cambio, la actina que se encuentra en el córtex celular en células vivas, aparece totalmente desorganizada durante la fase de ejecución de la apoptosis (Sánchez-Alcázar y cols., 2007). Para su formación y mantenimiento se necesita de mitocondrias hiperpolarizadas y de una gran producción de ATP (Oropesa-Ávila y cols., 2013), de otra manera el AMN se vería afectado (Oropesa y cols., 2011). Se ha demostrado su existencia en diferentes tipos de cultivos celulares como en la línea celular de cáncer de

pulmón de células no pequeñas H-460, en la línea celular LLC PK-1 $\alpha$  (Sánchez-Alcázar y cols., 2007) o en la línea celular de cáncer cervical inmortal HeLa (Moss y cols., 2009), formando la misma estructura que la visualizada en nuestro estudio en dHESC. El sistema reproductor femenino experimenta mensualmente cambios cíclicos hormonales que causan proliferación celular y apoptosis en el tejido endometrial. Son varios los estudios que muestran la importancia de la apoptosis en el tejido decidualizado para permitir un crecimiento embrionario temprano de manera precisa (Kayisli y cols., 2003; Li y cols., 2003), sin embargo, se trata de la primera vez que se visualiza el AMN en dHESC. Estos descubrimientos demuestran que la apoptosis en el endometrio es, incluso antes de la adhesión embrionaria, un proceso importante que muestra estar muy regulado, al menos, *in vitro*. Estas células forman el AMN para evitar procesos de daño celular en el ciclo endometrial. El cobre, por su lado, no influyó en el tipo de formación de AMN en dHESC.

Nuestro siguiente objetivo consistía en estudiar el efecto del cobre sobre la expresión génica de las dHESC. Con respecto a la transcriptómica endometrial, existían numerosos estudios publicados en los últimos 20 años en los que cada uno de ellos propone una gran cantidad de genes involucrados en el desarrollo de la ventana de implantación (WOI). En la década pasada se demostró, de forma evidente, la existencia de una falta de consenso en las primeras publicaciones sobre receptividad endometrial. En una de las primeras comparaciones se constató cómo, en las primeras 4 publicaciones sobre transcriptómica de la receptividad endometrial Kao cols., 2002; Carson cols., Borthwick cols., 2003; Riesewijk y cols., 2003, solamente 4 genes (3 sobre-expresado y 1 reprimido) estaban presentes en todas (Horcajadas y cols., 2005). A pesar de ello, en el año 2007 se publicó una lista de 25 genes relevantes en el desarrollo de la WOI. Esta lista fue elaborada de una manera simplista, ya que se comparó estudios endometriales en diferentes situaciones: en endometrios fértiles (ciclos naturales), sub-fértiles (ciclos estimulados) y en condiciones de contracepción (presencia de DIU inertes) (Horcajadas y cols., 2007).

En los siguientes años muchos autores intentaron crear su propia lista de genes WOI. A pesar de la explosión de conocimiento generada por el Proyecto Genoma Humano, las nuevas tecnologías y el desarrollo de la bioinformática para dar un significado biológico a estos cambios de expresión génica, los diferentes resultados obtenidos en distintas plataformas de análisis no consiguieron alcanzar un consenso sobre este tema.

Una de las aproximaciones más fructíferas para diagnosticar el estadio endometrial desde un punto de vista molecular se consiguió en el año 2011 con el test ERA (Díaz-Gimeno y cols., 2011). Esta herramienta de diagnóstico endometrial durante la WOI, utiliza la tecnología de microarrays para obtener el perfil transcriptómico de la receptividad endometrial a través de 238 genes. El análisis de las biopsias endometriales permite a los clínicos determinar de manera personalizada la WOI de cada paciente, y así elegir el mejor momento para transferir el embrión, sincronizando, de esta manera, el endometrio receptivo con la llegada del blastocisto.

El obstáculo más importante del test ERA fue que se desarrolló a partir de la información obtenida en experimentos realizados a principios de la década de los 2000, cuando la tecnología utilizada en las transcriptómica estaba mucho menos desarrollada de lo que lo está hoy en día. De hecho, el microarray de expresión génica no contenía sondas para el genoma humano completo. Una de las principales debilidades de este test es que en la selección de genes únicamente se utilizaron 5 muestras en 4 días distintos tras el pico de LH en orina (LH+1, LH+3, LH+5 y LH+7), datos procedentes de la publicación de Horcajadas y cols., publicados en el año 2008. Además, no contiene genes de función desconocida pero útiles como marcadores, y tampoco utiliza genes descubiertos en otras plataformas de análisis transcriptómicos o descubiertos por otros investigadores. Los datos obtenidos en aquella publicación se obtuvieron en la plataforma Affymetrix y se implementaron en otra plataforma, Agilent, lo que produjo que muchos genes que se esperaban fueran a ser buenos marcadores de receptividad endometrial, no experimentaran cambios a lo largo



de la ventana de implantación en posteriores estudios. Los datos de expresión génica obtenidos desde entonces con las nuevas técnicas y los nuevos softwares de análisis, han resultado ser una poderosa herramienta para la creación de una nueva lista de genes relacionados con la receptividad endometrial y la respuesta inmunológica.

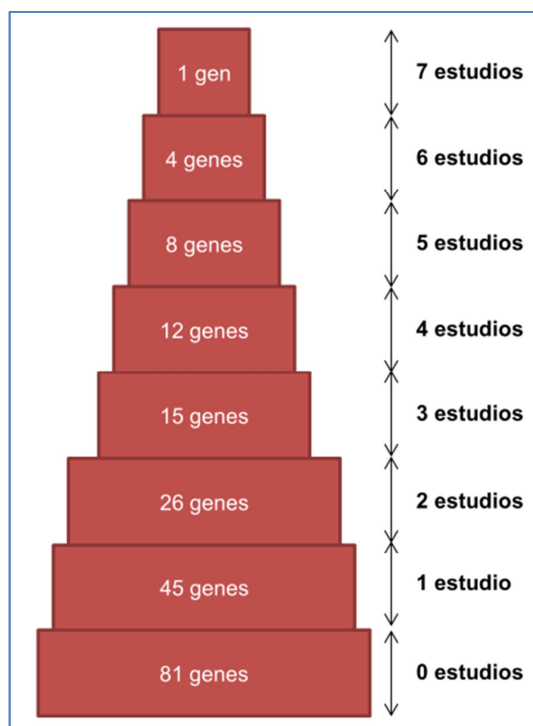
Fue por esta razón por la que consideramos que para estudiar el efecto del cobre sobre la transcriptómica de las células endometriales de forma más precisa, era necesario un estudio más extenso, profundo y sobre todo actualizado, para evaluar qué genes de la WOI tenían un mayor significado biológico para su estudio. Esto supuso, finalmente, nuestro **tercer objetivo**, generar una nueva lista de genes WOI. Para ello realizamos una búsqueda bibliográfica exhaustiva en la base de datos *online* en *PubMed* desde el año 2005, con una serie de criterios de búsqueda, para seleccionar genes relacionados con la receptividad endometrial y para comprender cuáles de ellos reflejaban con mayor exactitud y precisión el estadio de receptividad endometrial. Finalmente, se seleccionaron 192 genes relevantes al proceso de desarrollo de receptividad endometrial. Estos genes fueron publicados en un total de 71 artículos científicos entre el año 2005 y 2015, referenciados en la tabla I. Sólo 53 de los 192 genes se encuentran representados en el test ERA (Díaz-Gimeno y cols., 2011) y solo 7 con la lista de 25 generada con anterioridad por Horcajadas en 2007: glutación peroxidasa 3 (GPX3), factor inhibidor de leucemia (LIF), el gen de la proteína 3 de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina (IGFBP3), el gen de la proteína inducible por daño y de detección del crecimiento alfa (GADD45A), clusterina (CLU), calpaina 6 (CAPN6) y catenina alfa 2 (CTNNA2).

Al realizar una comparación de los 192 genes WOI seleccionados en nuestro estudio junto con los 7 estudios transcriptómicos que utilizaban microarrays (Carson y cols., 2002; Kao y cols., 2002; Borthwick y cols., 2003; Riesewijk y cols., 2003; Mirkin y cols., 2005; Díaz-Gimeno y cols., 2011) o RNA-seq (Hu y cols., 2014) en endometrios en ciclos naturales, pudimos comprobar que había una gran diferencia en los genes seleccionados entre los estudios.

Estas diferencias en los perfiles de expresión génica encontrada entre los estudios se deben al diseño experimental empleado en cada caso, ya que existen diferencias en el día del ciclo menstrual en el que se tomaron las biopsias, las fases del ciclo menstrual comparadas, la mezcla o no de los RNAs totales, la tecnología empleada (microarrays o RNA-seq), las diferentes versiones dentro de la misma tecnología y, finalmente, los diferentes métodos empleados en el análisis de los datos obtenidos. El estudio con el que compartíamos una mayor cantidad de genes es con el llevado a cabo por Hu y colaboradores en 2014 que empleaba RNA-seq y comparaba perfiles génicos en LH+2 y en LH+7 (85 genes). Por el contrario hay solo 6 genes en común con el estudio llevado a cabo por Carson y colaboradores en el 2002, en el que se utilizan microarrays y se comparan perfiles genéticos de biopsias endometriales de LH+2, LH+3 y LH+4 con biopsias endometriales en LH+7, LH+8 y LH+9.

Hasta 126 genes de los 192 genes WOI incluidos en este estudio, un 65% del total, no estaban en ningún estudio o solamente estaban presentes en uno (figura 24). Solo el gen de la osteopontina (SPP1) que codifica para una glicoproteína de la matriz extracelular se encuentra presente en los 7 estudios analizados (figura 25). Esta glicoproteína ha sido relacionada con procesos de adhesión celular y con la implantación embrionaria en modelos in vitro de ratones y en trofoblastos JAR y la línea establecida JEG-3 (Kang y cols., 2014; Wu y cols., 2015). Los cuatro genes que aparecen en, al menos 6 de las 7 publicaciones analizadas, son: la claudina 4 (CLDN4), la proteína inducible por daño y de detección del crecimiento alfa (GADD45A), la interleucina 15 (IL15) y la monoamino oxidasa (MAOA) (figura 25). La claudina 4 codifica para una proteína integral de membrana relacionada con la implantación embrionaria cuya expresión ha sido utilizada como posible marcador de embarazo (Serafini y cols., 2009), y, en los casos cuya expresión es muy elevada ha sido relacionada con un tasas de fertilidad bajas (Mikolajczyk y cols., 2013) La proteína codificada por el gen GADD45A se expresa en condiciones de estrés celular, y ha sido relacionada también en los procesos de implantación embrionaria (Liu y cols., 2014). La interleucina 15 regula la activación y proliferación de células NK y

linfocitos T, está implicada en la decidualización del endometrio (Godbole y cols., 2010) y en la implantación embrionaria, estando alterada su expresión en pacientes con fallo de implantación (Mariee y cols., 2012). Finalmente, el gen MAOA codifica para enzimas mitocondriales y está relacionada al igual que los otros 3 genes con la implantación embrionaria y la receptividad endometrial (Zhang y cols., 2011).



**Figura 24. Pirámide representativa de los 192 genes de la WOI seleccionados en este estudio en comparación con 7 estudios transcriptómicos (Carson y cols., 2002; Kao y cols., 2002; Borthwick y cols., 2003; Riesewijk y cols., 2003; Mirkin y cols., 2005; Díaz-Gimeno y cols., 2011; Hu y cols., 2014). Se indica el número de genes que no aparecen en ningún estudio, o que aparecen en 1, 2, 3, 4, 5, 6 o en los 7 estudios transcriptómicos con los que se han comparado.**

Al comparar los perfiles de expresión génica en ciclos naturales entre estadios receptivos (LH+7) y pre-receptivos (LH+2), se comprobó que la mayor

parte de los genes estudiados, un 83,33% se encontraban sobre-expresados (85), frente al 17,77% que se encontraban reprimidos (17). Al comparar estos resultados con los 7 estudios transcriptómicos del endometrio citados con anterioridad, nos encontramos que en 4 de ellos había una mayoría de genes sobre-expresados (Riesewijk=72,5%, Borthwick=70,20%, Díaz-Gimeno=68,07%, y Carson=54,44%) mientras que en 3 de ellos suponían una menor parte que los reprimidos (Hu=46,33, Mirkin =45,79% y Kao=30,41%). Como indicábamos antes, las diferencias pueden deberse a las diferentes tecnologías utilizadas, sistemas de análisis o al tipo de muestras seleccionadas.

También se realizó un análisis de ontología génica de los genes WOI que mostró varios procesos biológicos relacionados con el sistema inmunológico como la respuesta a heridas, la respuesta defensiva o la regulación positiva de procesos del sistema inmunológicos. Las funciones moleculares descubiertas estaban relacionadas con la actividad de las citoquinas, con la actividad de factores de crecimiento, con la unión de iones de cadmio y con la actividad antioxidante, mientras que los resultados analizados de los componentes celulares de estos 192 genes revelaron la región extracelular y el espacio extracelular como las regiones significativas (tabla III). Estos resultados sugieren un papel principal del sistema inmunológico en la receptividad endometrial así como de diferentes receptores y ligandos para la implantación embrionaria.

Finalmente y para completar la descripción del grupo de genes WOI, se llevó a cabo un análisis con la plataforma STRING para el estudio proteico de estos genes. Este estudio reveló una elevada interacción proteína-proteína de los 192 genes WOI\*. Concretamente, el sistema reveló 242 interacciones entre las proteínas de los genes WOI, cuando el número esperado de interacciones de un conjunto aleatorio de proteínas con el mismo número era de 103. Estos resultados demuestran la conexión existente entre estos genes y muestran cómo de complejo y controlado es el proceso de receptividad endometrial.

Nuestro **cuarto objetivo** consistió, por medio de una novedosa técnica de qPCR en microfluidos, en analizar la expresión de los genes WOI en HESC y en dHESC con o sin cobre o CPT. Tanto el cobre como el CPT inducen un cambio general del perfil de expresión génica de receptividad endometrial. El análisis de las dHESC en presencia de cobre mostró cambios en 49 de los 192 genes WOI. El tratamiento con cobre alteró la firma transcriptómica de las células decidualizadas, incluyendo algunos genes implicados en el desarrollo endometrial y en trastornos endometriales. Entre esos 49 genes, 13 han sido relacionados en diferentes estudios con el proceso de decidualización (CXCL6, CSRP2, FOXO1, HOXA11, IL1R1, IL5, IL8, IL11, IL15, LIF, TNF y TNFRSF11B). Algunos de estos genes cambian su expresión génica durante los procesos de decidualización de las HESC debido a factores liberados por células NK (por sus siglas en inglés, *natural killer*) que tienen efectos paracrinós en el endometrio (Germeyer y cols., 2009). Otros genes están relacionados con la red de genes de decidualización regulados por los receptores de progesterona y de andrógenos, esenciales en la preparación del endometrio para la implantación embrionaria (Popovici y cols., 2000; Dimitriadis y cols., 2002; Takano y cols., 2007; Cloke y cols., 2008), otros inducen resistencia en HESC al estrés oxidativo (Kajihara y cols., 2012) o actúan como reguladores transcripcionales de algunos genes importantes de la decidualización como el receptor de progesterona, el factor de crecimiento insulínico o la familia activadora de proteínas 1 (Lynch y cols., 2009; Mazur y cols., 2015; Vasquez y cols., 2015).

Al analizar con profundidad la alteración de la expresión génica inducida por el cobre y los estudios publicados sobre estos genes y la endometriosis, comprobamos que hasta 19 de los 49 genes tienen importantes implicaciones en esta enfermedad. La endometriosis es una enfermedad ginecológica en la cual el tejido endometrial crece y se desarrolla fuera del útero, afectando hasta a más de un 10% de las mujeres y causando fuertes dolores e infertilidad (Giudice y Kao, 2004). Una de las principales causas por la que esta enfermedad causa infertilidad es por la decidualización anormal de las HESC a través de una reducción significativa de los niveles de transcripción génica de FOXO1 y de

IGFBP1 (Yin y cols., 2012), ambos genes también reducidos en su transcripción en este estudio. Con el inicio de la enfermedad se produce una sobre expresión de los genes SLPI y ESR, causando una desregulación de otros genes relacionados con procesos inflamatorios y respuesta inmunitaria entre otros (Suzumori y cols., 1999; Abu-Asab y cols., 2011), datos en conformidad con los obtenidos en el efecto del cobre. El gen CLDNA4 es otro gen relacionado con la formación de la endometriosis, sin embargo existe controversia sobre la desregulación de este gen. Por un lado se ha publicado un estudio que indica altos niveles de transcripción de este gen (Mikolajczyk y cols., 2013), mientras que hay dos investigaciones que hablan del descenso de los niveles de expresión génica del CLDNA4 (Pan y cols., 2008; 2009). Alguno de los genes desregulados en este proyecto como IL15 y LEP están implicados en las características de las células de endometriosis de crecimiento, migración e invasión (Ahn y cols., 2015; Yu y cols., 2016). La endometriosis discurre con asiduidad con lesiones que deben ser retiradas mediante cirugía. En estas lesiones se ha asociado una sobreexpresión del gen CXCL6 (Tan y cols., 2014, al igual que en la presencia de cobre. La infertilidad asociada a esta enfermedad es el resultado de la combinación de factores ambientales y de múltiples genes como HOXA11, cuya represión (mismo resultado que en este estudio) está vinculada con el fallo de implantación embrionaria (Szczepanska y cols., 2012; Jana y cols., 2013). Otro dato interesante que hemos aportado en esta investigación es la represión del gen PGR por tratamiento con cobre, la cual conlleva una pérdida en la transmisión de señales paracrinas desarrollando de esta manera resistencia a la progesterona en mujeres con endometriosis (Bulun y cols., 2010). Hemos encontrado también diferencias en expresión génica como consecuencia del tratamiento con cobre en otros 11 genes asociados con la endometriosis (ANGPTL1, C4BPA, CRISP3, CXCL14, GAST, IL8, IL11, LIF, MT1E, TNF y TNFRSF11B) (Isaacson y cols., 1989; Dimitriadis y cols., 2006; Wu y cols., 2006; Van Langendonck y cols., 2007; Mathew y cols., 2016). Es de resaltar un estudio en particular en el que exploran la conexión entre la presencia de elementos traza en mujeres con el desarrollo de endometriosis, concluyendo que la presencia de cobre en orina se correlaciona con una mayor probabilidad

de ser diagnosticada de endometriosis (Pollack y cols., 2013). Sin embargo, no tenemos conocimiento de ningún estudio que intente establecer asociaciones entre los DIUs de cobre y la endometriosis.

Además de la endometriosis, otros desordenes ginecológicos como la preeclampsia y la infertilidad comparten con este estudio la desregulación de algunos genes. Hemos encontrado que 10 de los 49 genes desregulados por el cobre están asociados a infertilidad o al fallo de implantación. Como ya hemos explicado, C4BPA y HOXA11, genes cuya desregulación están asociados a la endometriosis, están ligados también a los problemas de infertilidad en estas pacientes Szczepanska y cols., 2012). Un estudio interesante llevado a cabo en ratones por Stewart y colaboradores en 1992, concluyó que la expresión endometrial del gen LIF era esencial para la implantación, ya que con un LIF disfuncional eran fértiles pero el blastocisto era incapaz de realizar la implantación (Stewart y cols., 1992). También hemos encontrado otros genes que han sido vinculados en otros estudios a fallos de implantación o a abortos, como son CRISP3, CSF3, IL8, IL11, MFAP5, MMP26 y WISP2 (Bersinger y cols., 2008; Altmae y cols., 2010; Turkyilmaz y cols., 2012), siendo la IL8 un gen clave en la patogénesis de las lesiones de implantación de venas (Bhasin y cols., 2012).

La preeclampsia es una de las complicaciones que pueden surgir en un embarazo, y se define por la presencia de hipertensión y de proteinuria. En ella el sistema inmunológico desempeña un rol importante con una inflamación sistémica y una desregulación de las citoquinas IL11 y TNF, implicadas en la patofisiología de la enfermedad (Basar y cols., 2010). Nosotros hemos encontrado un desajuste de ambas citoquinas en este estudio, encontrándose ambos niveles elevados en dHESC en presencia de cobre.

Las usuarias de DIU de cobre pueden presentar algunos efectos secundarios como el aumento del sangrado menstrual que puede perseverar en el tiempo (Hubacher, 2009), modificando la microvascularización subendometrial

(Jiménez, 2006). Las mujeres nulíparas usuarias de DIUs de cobre presentan una tasa de expulsión debido a dolores y sangrados de entre el 3,6% y el 24%, pudiendo ser esta tasa un poco más baja en mujeres con hijos (Hubacher, 2007). Nuestra hipótesis es que los efectos secundarios en algunas usuarias de DIUs de cobre se debe a que el cobre altera la firma transcriptómica endometrial involucrando a genes relacionados con enfermedades y trastornos endometriales diferentes del patrón de dHESC con o sin cobre.

Tras el análisis de los genes alterados por el tratamiento con cobre pudimos comprobar que había algunos procesos biológicos sobre representados como son la regulación de la quimiotaxis, la taxis, la regulación de la proliferación celular, el comportamiento de movimiento, respuesta inmunológica y las cascadas de señales intracelulares. El análisis de componentes principales de las muestras endometriales dio como resultado un desplazamiento de aquellas muestras que tenían cobre o CPT (más pronunciado), alterando el perfil de expresión génica de las dHESC (figura 19).

Esta selección de genes WOI fue utilizada para estudiar el efecto del cobre de los DIU en la receptividad endometrial utilizando cultivos in vitro y desarrollar una nueva herramienta diagnóstica de receptividad endometrial para su uso en clínica y en investigación.

Distintos estudios han investigado los genes de la WOI en ciclos naturales en la transición entre estadios pre-receptivos a estadios receptivos (Carson y cols., 2002; Kao y cols., 2002; Borthwick y cols., 2003; Riesewijk y cols., 2003; Mirkin y cols., 2005; Diaz-Gimeno y cols., 2011; Hu y cols., 2014). En nuestro estudio, pudimos comprobar que la decidualización in vitro tuvo un gran efecto en los genes de la WOI seleccionados, alterando la expresión de 132 de ellos. Realizando una comparación con los otros estudios in vivo mencionados con anterioridad, 88 de los 132 genes afectados por el proceso de decidualización in vitro estaban presentes en al menos uno de los estudios. Existía una concordancia (sobre-expresados o reprimidos en nuestro estudio y



los de comparación) del 70% con Kao, 72% con Borthwick, 76% con Riesewijk, 78% con Díaz-Gimeno y con el de Hu, y del 85% con Mirkin. Las diferencias en la desregulación génica entre los estudios puede deberse a que en el proyecto actual la decidualización se llevó a cabo en HESC in vitro. De hecho, al compararlo con un estudio de decidualización in vitro en el que examinaban 9 genes en común con el nuestro, la concordancia era del 100%, al estar sobre-expresados estos 9 genes en ambos (Brar y cols., 2001).

Los DIU inertes actúan sobre la receptividad del endometrio previniendo la transición que se produce a un perfil de expresión génica receptiva (Horcajadas y cols., 2006). Hay estudios que utilizan modelos animales en los que se ha comprobado un efecto perjudicial del cobre en el proceso de implantación embrionaria, ya que en su presencia el blastocisto es incapaz de implantar, y cuando se retira el cobre se produce una implantación exitosa con el consecuente embarazo (Chang y cols., 1970).

Tras realizar la selección de 192 genes de receptividad endometrial y ver su funcionamiento en investigación básica, nos planteamos si con esta selección genética se podría construir un nuevo test de receptividad endometrial para su uso en clínica. Considerábamos necesario el desarrollo de nuevos test de receptividad endometrial que abaratasen los costes de los test actuales y que fueran más precisos, reduciendo el número de genes a estudiar sin reducir la eficacia de la técnica.

Como hemos comentado con anterioridad, el proceso de implantación embrionaria requiere de un embrión sano en estadio de blastocisto, un endometrio receptivo y que se produzca un diálogo molecular entre ambos (Ruan y cols., 2014). Aunque los criterios morfológicos fueron los primeros utilizados para datar el endometrio (Noyes, 1950; 1975), se ha comprobado en estudios aleatorios que esta técnica no es precisa ni eficaz (Coutifaris y cols., 2004; Murray y cols., 2004). Siendo desaconsejada su utilización por la ASRM al no permitir discernir entre mujeres fértiles e infértiles así como para el

diagnóstico o el tratamiento de la deficiencia de la fase lútea (Practice Committee ASRM, 2015).

Otros marcadores histológicos como los pinópodos han sido también propuestos, pero al igual que con el dataje histológico de Noyes, su efectividad para el diagnóstico de la infertilidad es dudosa (Ordi y cols., 2003; Quinn y cols., 2007). Numerosas moléculas han sido propuestas como marcadores de receptividad endometrial, pero un solo marcador no puede reflejar de forma apropiada el complejo sistema de receptividad endometrial, por lo que se utilizan un número elevado de marcadores que va en aumento (Taube y cols., 2009).

Los análisis “ómicos” de gran rendimiento han sido ampliamente utilizados para estudiar el endometrio humano; la mayoría de ellos desde el punto de vista de la transcriptómica, representando el 61% de todas las publicaciones “ómicas” del endometrio (Altmae y cols., 2014). La principal tecnología utilizada para identificar los distintos perfiles de expresión génica en ciclos naturales han sido los microarrays (Carson y cols., 2002; Kao y cols., 2002; Borthwick y cols., 2003; Riesewijk y cols., 2003; Mirkin y cols., 2005). Todos estos estudios utilizaron la misma tecnología y descubrieron más de 100 genes con un Fold Change (FC)  $>2,0$  o  $<2,0$ . Las diferencias en el diseño experimental, en el análisis de los datos obtenidos, así como el día del ciclo endometrial para obtener las biopsias, el número de muestras, y la agrupación o no agrupación del RNA obtenido, hizo que hubiera diferencias en los resultados de la expresión génica de estos estudios. Como resumen, de todos los genes estudiados solamente uno, la osteopontina, estuvo presente en los cinco estudios, y solamente unas pocas moléculas estaban en cuatro de los cinco estudios. Estos genes están implicados en diferentes rutas moleculares como el metabolismo lipídico (APOD), respuesta inmunitaria (IL15), regulación del ciclo celular (GADD45A) o enzimas (MONOA) (Horcajadas y cols., 2007). Los microarrays han sido utilizados también para analizar la receptividad endometrial en ciclos sustituidos (Dumeaux y cols., 2006), en hiperestimulación ovárica controlada (Horcajadas y cols., 2005; Simón y cols., 2005) y en condiciones

fisiopatológicas como endometriosis (Kao y cols., 2003; Sun y cols., 2014), obesidad (Bellver y cols., 2011), en endometrios refractarios bajo la influencia de DIUs (Horcajadas y cols., 2006), en presencia de miomas endometriales (Horcajadas y cols., 2008b) o en cáncer (Risinger y cols., 2013).

En los cambios cíclicos del endometrio en el que pasa de un estadio pre-receptivo a receptivo hay cambios a nivel génico y molecular que preparan al endometrio para la implantación embrionaria y para mantener un diálogo molecular con el embrión. Los exosomas son a menudo utilizados para el contacto entre diferentes tipos celulares, ya que contienen en su interior diversas moléculas como proteínas, miRNA y mRNA. En este proyecto hemos analizado los mRNA contenidos en los exosomas para los 192 genes de la WOI en suero, plasma y orina. De los 192 genes testados únicamente detectamos la expresión de 11 genes, entre ellos el gen constitutivo TOP1. Sin embargo normalizando los datos obtenidos con el gen TOP1 no se han obtenido diferentes perfiles génicos de los estadios de receptividad endometrial. Al no haber en la bibliografía científica estudios sobre la expresión génica en los exosomas para el diagnóstico de receptividad endometrial, no hemos podido seleccionar genes reportados con anterioridad en la lista de 192 genes. Es por ello que se necesitan de más investigaciones que aclaren el contenido molecular de estos exosomas, intentando encontrar diferencias en los niveles de mRNA o miRNA.

Nuestro clasificador predictivo de receptividad endometrial con posible aplicación clínica está compuesto por 35 genes capaces de explicar la mayoría de la variabilidad entre las muestras. Aumentar el número de genes que lo componen no aportaría una mejor clasificación de las muestras en los diferentes estadios de receptividad endometrial.



## **9. PERSPECTIVAS**



El campo de la anticoncepción tuvo un gran desarrollo en la segunda mitad del siglo XX con la llegada de los DIU de cobre y los DIU hormonales. En los últimos 20 años ha habido poca investigación en esta área debido a que se ha alcanzado una gran eficacia en estos dispositivos. Sin embargo, es necesario que las investigaciones continúen para reducir los efectos secundarios de las usuarias del DIU (dolores, sangrados y expulsión del dispositivo) manteniendo o aumentando su eficacia. En este proyecto hemos conseguido desarrollar un nuevo sistema capaz de clasificar la receptividad endometrial con tan sólo 35 genes para su posible uso en un futuro tanto en investigación como en clínica. En investigación puede utilizarse en el campo de la anticoncepción para probar nuevos elementos o combinaciones de estos que aseguren un desplazamiento del perfil genético de receptividad endometrial, utilizando otras pruebas conjuntas para verificar su eficacia y seguridad. Podrá ser utilizada también para el estudio de patologías como endometriosis o en pacientes con fallo repetitivo de implantación. En el polo opuesto se pueden probar nuevas moléculas que aumenten la receptividad endometrial, consiguiendo mejores tasas de implantación embrionaria y embarazo. En las clínicas se trata de una herramienta de la nueva medicina personalizada. La posibilidad de poder predecir de manera exacta y personalizada la ventana de implantación de la paciente en cada transferencia embrionaria aumentará de manera significativa las tasas de implantación embarazo y de nacimientos de bebés sanos. Sería muy interesante su uso no solo en pacientes que hayan tenido ya fallos de FIV previos o abortos, si no en todas las pacientes que acudan a una clínica de reproducción asistida para aumentar las probabilidades de implantación y embarazo, reduciendo de esta manera el tiempo, coste y el estrés generado en los pacientes que tienen no consiguen el embarazo deseado.





## 10. CONCLUSIONES



1. El proceso de decidualización in vitro con AMPc, MPA y E2 durante 8 días tiene un gran impacto en dHESC, aumentando los niveles de apoptosis y necrosis.
2. La presencia de cobre en concentraciones similares a las utilizadas farmacológicamente en los DIUs de cobre no parece tener ningún efecto sobre dicho proceso de apoptosis.
3. Las dHESC in vitro forman un AMN de tipo apoptosis lenta o redondeada durante la fase de ejecución de la apoptosis.
4. Una nueva selección de marcadores de receptividad endometrial y de respuesta inmunológica ha sido creada utilizando los datos de las nuevas tecnologías desde el 2005, pudiendo ser utilizada en investigación.
5. El cobre altera el perfil de expresión génica de dHESC, sugiriendo un efecto disruptivo sobre la receptividad endometrial con consecuencias negativas sobre la implantación embrionaria.
6. Ha sido posible desarrollar un nuevo sistema de evaluación endometrial basado en genes de receptividad endometrial y respuesta inmune.
7. La herramienta clasificadora de receptividad endometrial puede predecir el estadio de receptividad endometrial utilizando para ello sólo 43 de los 192 genes propuestos inicialmente a través de qRT-PCR.
8. Los resultados transcriptómicos obtenidos a través de qRT-PCR en microfluidos con el RNA contenido en los exosomas de orina, plasma y suero no permite determinar los diferentes estadios de receptividad endometrial.



## 11. BIBLIOGRAFÍA



- Abot A, Fontaine C, Raymond-Letron I, Flouriot G, Adlanmerini M, Buscato M, Otto C, Berges H, Laurell H, Gourdy P *et al.* The AF-1 activation function of estrogen receptor alpha is necessary and sufficient for uterine epithelial cell proliferation in vivo. *Endocrinology* 2013;154: 2222-2233.
- Achache H, Tsafirir A, Prus D, Reich R, Revel A. Defective endometrial prostaglandin synthesis identified in patients with repeated implantation failure undergoing in vitro fertilization. *Fertility and sterility* 2010;94: 1271-1278.
- Aghajanova L, Hamilton AE, Giudice LC. Uterine receptivity to human embryonic implantation: histology, biomarkers, and transcriptomics. *Seminars in cell & developmental biology* 2008;19: 204-211.
- Al-Kafaji G, Al-Mahroos G, Alsayed NA, Hasan ZA, Nawaz S, Bakhiet M. Peripheral blood microRNA-15a is a potential biomarker for type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes. *Molecular medicine reports* 2015;12: 7485-7490.
- Altmae S, Esteban FJ, Stavreus-Evers A, Simon C, Giudice LC, Lessey BA, Horcujadas JA, Macklon NS, D'Hooghe T, Campoy C *et al.* Guidelines for the design, analysis and interpretation of 'omics' data: focus on human endometrium. *Human reproduction update* 2014;20: 12-28.
- Altmae S, Martinez-Conejero JA, Esteban FJ, Ruiz-Alonso M, Stavreus-Evers A, Horcujadas JA, Salumets A. MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif)* 2013;20: 308-317.
- Anjalika, Gupta I, Gupta SK, Ganguly NK. Reactive oxygen intermediates and reactive nitrogen intermediates in copper intrauterine device users. *Contraception* 1999;59: 67-70.
- Arici A, Seli E, Senturk LM, Gutierrez LS, Oral E, Taylor HS. Interleukin-8 in the human endometrium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1998;83: 1783-1787.
- Boroujerdnia MG, Nikbakht R. Beta3 integrin expression within uterine endometrium and its relationship with unexplained infertility. *Pakistan journal of biological sciences : PJBS* 2008;11: 2495-2499.
- Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, Hull ML, Teirney R, Phillips SC, Smith SK. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Molecular human reproduction* 2003;9: 19-33.
- Brahmi D, Steenland MW, Renner RM, Gaffield ME, Curtis KM. Pregnancy outcomes with an IUD in situ: a systematic review. *Contraception* 2012;85: 131-139.

- Bulmer JN, Lash GE. The Role of Uterine NK Cells in Normal Reproduction and Reproductive Disorders. *Advances in experimental medicine and biology* 2015;868: 95-126.
- Brar AK, Handwerger S, Kessler CA, Aronow BJ. Gene induction and categorical reprogramming during in vitro human endometrial fibroblast decidualization. *Physiological genomics* 2001;21:135-148.
- Bulmer JN, Morrison L, Longfellow M, Ritson A, Pace D. Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. *Human reproduction (Oxford, England)* 1991;6: 791-798.
- Burkman RT. Intrauterine devices and pelvic inflammatory disease: evolving perspectives on the data. *Obstetrical & gynecological survey* 1996;51: S35-41.
- Campbell NA RJ. Reproducción animal. In Panamericana EM (ed) *Biología*. 2005, pp. 964-986.
- Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, Yuan L, Fritz MA, Lessey B. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Molecular human reproduction* 2002;8: 871-879.
- Casals G, Ordi J, Creus M, Fabregues F, Carmona F, Casamitjana R, Balasch J. Expression pattern of osteopontin and alphavbeta3 integrin during the implantation window in infertile patients with early stages of endometriosis. *Human reproduction (Oxford, England)* 2012;27: 805-813.
- Casals G, Ordi J, Creus M, Fabregues F, Casamitjana R, Quinto L, Campo E, Balasch J. Osteopontin and alphavbeta3 integrin expression in the endometrium of infertile and fertile women. *Reproductive biomedicine online* 2008;16: 808-816.
- Coaker T, Downie T, More IA. Complex giant mitochondria in the human endometrial glandular cell: serial sectioning, high-voltage electron microscopic, and three-dimensional reconstruction studies. *Journal of ultrastructure research* 1982;78: 283-291.
- Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science (New York, NY)* 2003;300: 286-290.
- Coutifaris C, Myers ER, Guzick DS, Diamond MP, Carson SA, Legro RS, McGovern PG, Schlaff WD, Carr BR, Steinkampf MP *et al*. Histological



- dating of timed endometrial biopsy tissue is not related to fertility status. *Fertility and sterility* 2004;82: 1264-1272.
- Creighton CJ, Benham AL, Zhu H, Khan MF, Reid JG, Nagaraja AK, Fountain MD, Dziadek O, Han D, Ma L *et al.* Discovery of novel microRNAs in female reproductive tract using next generation sequencing. *PloS one* 2010;5: e9637.
- Cheng L, Che Y, Gulmezoglu AM. Interventions for emergency contraception. *The Cochrane database of systematic reviews* 2012: Cd001324.
- d'Arcangues C. Worldwide use of intrauterine devices for contraception. *Contraception* 2007;75: S2-7.
- Cornillie FJ, Lauweryns JM, Brosens IA. Normal human endometrium. *Gynecologic and obstetric investigation* 1985;20: 113-129.
- Daly DC, Maslar IA, Riddick DH. Prolactin production during in vitro decidualization of proliferative endometrium. *American journal of obstetrics and gynecology* 1983;145: 672-678.
- de Ziegler D, Fanchin R, de Moustier B, Bulletti C. The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. *Journal of reproductive immunology* 1998;39: 149-166.
- Diaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martinez-Conejero JA, Esteban FJ, Alama P, Pellicer A, Simon C. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertility and sterility* 2011;95: 50-60, 60.e51-15.
- Dominguez F, Avila S, Cervero A, Martin J, Pellicer A, Castrillo JL, Simon C. A combined approach for gene discovery identifies insulin-like growth factor-binding protein-related protein 1 as a new gene implicated in human endometrial receptivity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2003;88: 1849-1857.
- Dubowy RL, Feinberg RF, Keefe DL, Doncel GF, Williams SC, McSweet JC, Kliman HJ. Improved endometrial assessment using cyclin E and p27. *Fertility and sterility* 2003;80: 146-156.
- Gräfenberg E. Silk as anticoncipient. *Geburtenregelung - Vortraege und Verhandlungen des Aerztekursus* 1929;28-30.
- El-Badrawi HH, Hafez ES, Barnhart MI, Fayad M, Shafeek A. Ultrastructural changes in human endometrium with copper and nonmedicated IUDs in utero. *Fertility and sterility* 1981;36: 41-49.
- Fan CY, Cowden J, Simmons SO, Padilla S, Ramabhadran R. Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid

- developmental neurotoxicity screening. *Neurotoxicology and teratology* 2010;32: 91-98.
- Ferenzy A. Surface ultrastructural response of the human uterine lining epithelium to hormonal environment. A scanning electron microscopy study. *Acta Cytol* 1977;21: 566-572.
- Filomeni G, Piccirillo S, Graziani I, Cardaci S, Da Costa Ferreira AM, Rotilio G, Ciriolo MR. The isatin-Schiff base copper(II) complex Cu(isaepy)<sub>2</sub> acts as delocalized lipophilic cation, yields widespread mitochondrial oxidative damage and induces AMP-activated protein kinase-dependent apoptosis. *Carcinogenesis* 2009;30: 1115-1124.
- Fox C, Morin S, Jeong JW, Scott RT, Jr., Lessey BA. Local and systemic factors and implantation: what is the evidence? *Fertility and sterility* 2016;105: 873-884.
- Galliano D, Pellicer A. MicroRNA and implantation. *Fertility and sterility* 2014;101: 1531-1544.
- Garcia-Velasco JA, Fassbender A, Ruiz-Alonso M, Blesa D, D'Hooghe T, Simon C. Is endometrial receptivity transcriptomics affected in women with endometriosis? A pilot study. *Reproductive biomedicine online* 2015;31: 647-654.
- Garrido-Gomez T, Ruiz-Alonso M, Blesa D, Diaz-Gimeno P, Vilella F, Simon C. Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results. *Fertility and sterility* 2013;99: 1078-1085.
- Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Seminars in reproductive medicine* 2007;25: 445-453.
- Gemzell-Danielsson K, Berger C, P GLL. Emergency contraception -- mechanisms of action. *Contraception* 2013;87: 300-308.
- Gitlin JD. Wilson disease. *Gastroenterology* 2003;125: 1868-1877.
- Giudice LC. Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Human reproduction (Oxford, England)* 1999;14 Suppl 2: 3-16.
- Giudice LC, Dsupin BA, Irwin JC. Steroid and peptide regulation of insulin-like growth factor-binding proteins secreted by human endometrial stromal cells is dependent on stromal differentiation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1992;75: 1235-1241.
- Gomez E, Ruiz-Alonso M, Miravet J, Simon C. Human Endometrial Transcriptomics: Implications for Embryonic Implantation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2015;5: a022996.

- Group ECW. Intrauterine devices and intrauterine systems *Human reproduction update*. 2008, pp. 197-208.
- Guleria K, Agarwal N, Mishra K, Gulati R, Mehendiratta A. Evaluation of endometrial steroid receptors and cell mitotic activity in women using copper intrauterine device: Can Cu-T prevent endometrial cancer? *The journal of obstetrics and gynaecology research* 2004;30: 181-187.
- Hammond SM. An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews* 2015;87: 3-14.
- Haouzi D, Assou S, Mahmoud K, Tondeur S, Reme T, Hedon B, De Vos J, Hamamah S. Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Human reproduction (Oxford, England)* 2009;24: 1436-1445.
- Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, Reme T, Dewailly D, Hamamah S. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Human reproduction (Oxford, England)* 2009;24: 198-205.
- Hey NA, Graham RA, Seif MW, Aplin JD. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1994;78: 337-342.
- Holdsworth-Carson SJ, Fung JN, Luong HT, Sapkota Y, Bowdler LM, Wallace L, Teh WT, Powell JE, Girling JE, Healey M *et al*. Endometrial vezatin and its association with endometriosis risk. *Human reproduction (Oxford, England)* 2016;31: 999-1013.
- Horcajadas JA, Riesewijk A, Polman J, van Os R, Pellicer A, Mosselman S, Simon C. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Molecular human reproduction* 2005;11: 195-205.
- Horcajadas JA, Sharkey AM, Catalano RD, Sherwin JR, Dominguez F, Burgos LA, Castro A, Peraza MR, Pellicer A, Simón C. Effect of an intrauterine device on the gene expression profile of the endometrium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2006;91: 3199-3207.
- Horcajadas JA, Mínguez P, Dopazo J, Esteban FJ, Domínguez F, Giudice LC, Pellicer A, Simón C. Controlled ovarian stimulation induces a functional genomic delay of the endometrium with potential clinical implications. *Endocrine research* 2008<sup>a</sup>;93: 4500-4510.
- Horcajadas JA, Goyri E, Higón MA, Martínez-Conejero JA, Gambadauro P, García G, Meseguer M, Simón C, Pellicer A. Endometrial receptivity and

implantation are not affected by the presence of uterine intramural leiomyomas: a clinical and functional genomics delay. *Endocrine care* 2008<sup>b</sup>;93: 3490-3498.

Hu S, Yao G, Wang Y, Xu H, Ji X, He Y, Zhu Q, Chen Z, Sun Y. Transcriptomic changes during the pre-receptive to receptive transition in human endometrium detected by RNA-Seq. *The journal of clinical endocrinology and metabolism* 2014;99: E2744-2753.

Hubacher D. Copper intrauterine device use by nulliparous women: review of side effects. *Contraception* 2007;75: S8-11.

Ishii S, Segawa T, Okabe S. Simultaneous quantification of multiple food- and waterborne pathogens by use of microfluidic quantitative PCR. *Applied and environmental microbiology* 2013;79: 2891-2898.

Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, Critchley HO. Endocrine regulation of menstruation. *Endocrine reviews* 2006;27: 17-46.

Jimenez MF, Passos EP, Fagundes PA, de Freitas FM, Arbo E, Cunha-Filho JS. Effect of the copper-intrauterine device (TCu 380A) on subendometrial microvascularization and uterine artery blood flow. *Fertility and sterility* 2006;86: 1780-1782.

Jolliffe IT. Discarding variables in a principal component analysis. I: artificial data. *Journal of the Royal Statistical Society, Series C: Applied statistics* 1972;21: 160-173.

Jolliffe IT. Discarding variables in a principal component analysis. II: real data. *Journal of the Royal Statistical Society, Series C: Applied statistics* 1973;22: 21-31

Jones RL, Salamonsen LA, Findlay JK. Potential roles for endometrial inhibins, activins and follistatin during human embryo implantation and early pregnancy. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2002;13: 144-150.

Kang YJ, Forbes K, Carver J, Aplin JD. The role of the osteopontin-integrin alphavbeta3 interaction at implantation: functional analysis using three different in vitro models. *Human reproduction (Oxford, England)* 2014;29: 739-749.

Kao LC, Tulac S, Lobo S, Imani B, Yang P, Germeyer A, Osteen K, Taylor RN, Lessey BA, Giudice LC. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. *Endocrinology* 2002;143: 2119-2138.

Kawakami M, Inagawa R, Hosokawa T, Saito T, Kurasaki M. Mechanism of apoptosis induced by copper in PC12 cells. *Food and chemical toxicology* :

*an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2008;46: 2157-2164.

- Kliman HJ, Honig S, Walls D, Luna M, McSweet JC, Copperman AB. Optimization of endometrial preparation results in a normal endometrial function test (EFT) and good reproductive outcome in donor ovum recipients. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2006;23: 299-303.
- Koler M, Achache H, Tsafrir A, Smith Y, Revel A, Reich R. Disrupted gene pattern in patients with repeated in vitro fertilization (IVF) failure. *Human reproduction (Oxford, England)* 2009;24: 2541-2548.
- Koot YE, van Hooff SR, Boomsma CM, van Leenen D, Groot Koerkamp MJ, Goddijn M, Eijkemans MJ, Fauser BC, Holstege FC, Macklon NS. An endometrial gene expression signature accurately predicts recurrent implantation failure after IVF. *Scientific reports* 2016;6: 19411.
- Kresowik JD, Devor EJ, Van Voorhis BJ, Leslie KK. MicroRNA-31 is significantly elevated in both human endometrium and serum during the window of implantation: a potential biomarker for optimum receptivity. *Biology of reproduction* 2014;91: 17.
- Kulier R, Helmerhorst FM, O'Brien P, Usher-Patel M, d'Arcangues C. Copper containing, framed intra-uterine devices for contraception. *The Cochrane database of systematic reviews* 2006: Cd005347.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409: 860-921.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75: 843-854.
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Harris J, Sun J, Young SL, Wolf L. Improvement in pregnancy rates with GnRH agonist in women with infertility, minimal or mild endometriosis and aberrant v $\beta$ 3 expression *Amer Soc Reprod Med Annual Mtg.* 1996.
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Sawin SW, Sun J. Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility. *Fertility and sterility* 1995;63: 535-542.
- Lessey BA, Castelbaum AJ, Wolf L, Greene W, Paulson M, Meyer WR, Fritz MA. Use of integrins to date the endometrium. *Fertility and sterility* 2000;73: 779-787.
- Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with

- the normal and abnormal menstrual cycle. *The Journal of clinical investigation* 1992;90: 188-195.
- Lippes J. Contraception with intrauterine plastic loops. *American journal of obstetrics and gynecology* 1965;93: 1024-1030.
- Liu Y, Lee KF, Ng EH, Yeung WS, Ho PC. Gene expression profiling of human peri-implantation endometria between natural and stimulated cycles. *Fertility and sterility* 2008;90: 2152-2164.
- Lugli G, Cohen AM, Bennett DA, Shah RC, Fields CJ, Hernandez AG, Smalheiser NR. Plasma Exosomal miRNAs in Persons with and without Alzheimer Disease: Altered Expression and Prospects for Biomarkers. *PloS one* 2015;10: e0139233.
- Lynch VJ, Brayer K, Gellersen B, Wagner GP. HoxA-11 and FOXO1A cooperate to regulate decidual prolactin expression: towards inferring the core transcriptional regulators of decidual genes. *PLos One* 2009;4: e6845.
- Magaye R, Zhao J, Bowman L, Ding M. Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles. *Experimental and therapeutic medicine* 2012;4: 551-561.
- Martel D, Malet C, Gautray JP, Psychoyos A. Surface Changes of the Luminal Uterine Epithelium during the Human Menstrual Cycle: A Scanning Electron Microscopic Study. In de Brux J, Mortel R and Gautray JP (eds) *The Endometrium: Hormonal Impacts*. 1981. Springer US, Boston, MA, pp. 15-29.
- Maruyama T, Yoshimura Y. Molecular and cellular mechanisms of differentiation and regeneration of the uterine endometrium. *Endocrine journal* 2008;55: 795-810.
- Masterton R AE, More IAR. The cyclic variation in the percentage of ciliated cells in the normal human endometrium. *J Reprod Fertil* 1975;42: 537-540.
- Mazur EC, Vasquez YM, Li X, Kommagani R, Jiang L, Chen R, Lanz RB, Kovanci E, Gibbons WE, DeMayo FJ. Progesterone receptor transcriptome and cistrome in decidualized human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 2015;156: 2239-2253.
- Medicine PCotASfR. Current clinical irrelevance of luteal phase deficiency: a committee opinion *Fertility and sterility*. 2015, pp. e27-32.
- Messinis IE. From menarche to regular menstruation: endocrinological background. *Annals of the New York Academy of sciences* 2006.
- Metwally M, Preece R, Thomas J, Ledger W, Li TC. A proteomic analysis of the endometrium in obese and overweight women with recurrent

- miscarriage: preliminary evidence for an endometrial defect. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2014;12: 75.
- Meyer WR, Castelbaum AJ, Somkuti S, Sagoskin AW, Doyle M, Harris JE, Lessey BA. Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity. *Human reproduction (Oxford, England)* 1997;12: 1393-1398.
- Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, Bocca S, Oehninger S. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Human reproduction (Oxford, England)* 2005;20: 2104-2117.
- Mirkin S, Nikas G, Hsiu JG, Diaz J, Oehninger S. Gene expression profiles and structural/functional features of the peri-implantation endometrium in natural and gonadotropin-stimulated cycles. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2004;89: 5742-5752.
- Moore K PT. *Embriología clínica, El aparato genitourinario*. 8ª edición edn, 2008. Editorial Elsevier.
- More IA, Armstrong EM, Carty M, McSeveney D. Cyclical changes in the ultrastructure of the normal human endometrial stromal cell. *The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Commonwealth* 1974;81: 337-347.
- Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, Lessey BA, Novotny DB, Ireland K, Zeng D, Fritz MA. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertility and sterility* 2004;81: 1333-1343.
- Navot D, Scott RT, Driesch K, Veeck LL, Liu HC, Rosenwaks Z. The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertility and sterility* 1991;55: 114-118.
- Ng YH, Rome S, Jalabert A, Forterre A, Singh H, Hincks CL, Salamonsen LA. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: a new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. *PloS one* 2013;8: e58502.
- Nikas G, Drakakis P Fau - Loutradis D, Loutradis D Fau - Mara-Skoufari C, Mara-Skoufari C Fau - Koumantakis E, Koumantakis E Fau - Michalas S, Michalas S Fau - Psychoyos A, Psychoyos A. Uterine pinopodes as markers of the 'nidation window' in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Human Reproduction* 1995;10 (5): 1208-1213.
- Noyes R, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertility and sterility* 1950;1: 3-17.
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *American journal of obstetrics and gynecology* 1975;122: 262-263.

- O'Malley BW, Tsai MJ. Molecular pathways of steroid receptor action. *Biology of reproduction* 1992;46: 163-167.
- Ohlsson Teague EM, Van der Hoek KH, Van der Hoek MB, Perry N, Wagaarachchi P, Robertson SA, Print CG, Hull LM. MicroRNA-regulated pathways associated with endometriosis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 2009;23: 265-275.
- Ordi J, Creus M, Quinto L, Casamitjana R, Cardesa A, Balasch J. Within-subject between-cycle variability of histological dating, alpha v beta 3 integrin expression, and pinopod formation in the human endometrium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2003;88: 2119-2125.
- Ortiz ME, Croxatto HB. Copper-T intrauterine device and levonorgestrel intrauterine system: biological bases of their mechanism of action. *Contraception* 2007;75: S16-30.
- Ortiz ME, Croxatto HB, Bardin CW. Mechanisms of action of intrauterine devices. *Obstetrical & gynecological survey* 1996;51: S42-51.
- Oruc S, Vatansever HS, Karaer O, Eskicioglu F, Narlikuyu B. Changes in distribution patterns of integrins in endometrium in copper T380 intrauterine device users. *Acta histochemica* 2005;107: 95-103.
- Parmley TH, Roberts DK, Emsa NJ, Horbelt DV. Intercellular contacts between stromal cells in the normal human endometrium throughout the menstrual cycle. *Human pathology* 1990;21: 1063-1066.
- Patai K, Szilagyi G, Noszal B, Szentmariay I. Local tissue effects of copper-containing intrauterine devices. *Fertility and sterility* 2003;80: 1281-1283.
- Perez L. Anomalías Müllerianas. Revisión. *Revista Médica* 2007;15 (2): 251-260.
- Ponnampalam AP, Weston GC, Trajstman AC, Susil B, Rogers PA. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. *Molecular human reproduction* 2004;10: 879-893.
- Popovici RM, Kao Lc, Giudice LC. Discovery of new inducible genes in in vitro decidualized human endometrial stromal cells using microarray technology. *Endocrinology* 2000;141: 3510-3513.
- Prapas Y, Prapas N, Jones EE, Duleba AJ, Olive DL, Chatziparasidou A, Vlassis G. The window for embryo transfer in oocyte donation cycles depends on the duration of progesterone therapy. *Human reproduction* 1998;13: 720-723.



- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertility and sterility* 2015;103: 44-50.
- Quinn C, Ryan E, Claessens EA, Greenblatt E, Hawrylyshyn P, Cruickshank B, Hannam T, Dunk C, Casper RF. The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window. *Fertility and sterility* 2007;87: 1015-1021.
- Richter R. A means of preventing pregnancy. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1909;35: 1525.
- Rajalakshmi S, Weyhermuller T, Dinesh M, Nair BU. Copper(II) complexes of terpyridine derivatives: a footstep towards development of antiproliferative agent for breast cancer. *Journal of inorganic biochemistry* 2012;117: 48-59.
- Reinprayoon D. Intrauterine contraception. *Current opinion in obstetrics & gynecology* 1992;4: 527-530.
- Reinprayoon D, Koetsawang S, Shu-rong Z, Shang-chun W. The TCu 380A IUD and the frameless IUD "the FlexiGard": interim three-year data from an international multicenter trial. UNDP, UNFPA, and WHO Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction, World Bank: IUD Research Group. *Contraception* 1995;52: 77-83.
- Revel A, Achache H, Stevens J, Smith Y, Reich R. MicroRNAs are associated with human embryo implantation defects. *Human reproduction (Oxford, England)* 2011;26: 2830-2840.
- Riesewijk A, Martin J Fau - van Os R, van Os R Fau - Horcajadas JA, Horcajadas Ja Fau - Polman J, Polman J Fau - Pellicer A, Pellicer A Fau - Mosselman S, Mosselman S Fau - Simon C, Simon C. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Molecular human reproduction* 2003;9(5): 253-264.
- Robert A, Trussell J, Nelson AL, Cates W, Kowel D, Pollicar MS. *Contraceptive Technology*. 20th Revised edition edn, 2011. Bridging the Gap Communication.
- Roberts DK, Walker NJ, Lavia LA. Ultrastructural evidence of stromal/epithelial interactions in the human endometrial cycle. *American journal of obstetrics and gynecology* 1988;158: 854-861.
- Rogers PA, Murphy CR. Morphometric and freeze fracture studies of human endometrium during the peri-implantation period. *Reproduction, fertility, and development* 1992;4: 265-269.

- Ruan YC, Chen H, Chan HC. Ion channels in the endometrium: regulation of endometrial receptivity and embryo implantation. 2014;4: 517-529.
- Saito S, Shiozaki A, Sasaki Y, Nakashima A, Shima T, Ito M. Regulatory T cells and regulatory natural killer (NK) cells play important roles in feto-maternal tolerance. *Seminars in immunopathology* 2007;29: 115-122.
- Saleh L, Otti GR, Fiala C, Pollheimer J, Knofler M. Evaluation of human first trimester decidual and telomerase-transformed endometrial stromal cells as model systems of in vitro decidualization. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2011;9: 155.
- Sarani SA, Ghaffari-Novin M, Warren MA, Dockery P, Cooke ID. Morphological evidence for the 'implantation window' in human luminal endometrium. *Human reproduction (Oxford, England)* 1999;14: 3101-3106.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science (New York, NY)* 1995;270: 467-470.
- Schmitz C, Yu L, Bocca S, Anderson S, Cunha-Filho JS, Rhavi BS, Oehninger S. Role for the endometrial epithelial protein MFG-E8 and its receptor integrin alphavbeta3 in human implantation: results of an in vitro trophoblast attachment study using established human cell lines. *Fertility and sterility* 2014;101: 874-882.
- Schulte C, Molz S, Appelbaum S, Karakas M, Ojeda F, Lau DM, Hartmann T, Lackner KJ, Westermann D, Schnabel RB *et al.* miRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease. *PLoS one* 2015;10: e0145930.
- Sha AG, Liu JL, Jiang XM, Ren JZ, Ma CH, Lei W, Su RW, Yang ZM. Genome-wide identification of micro-ribonucleic acids associated with human endometrial receptivity in natural and stimulated cycles by deep sequencing. *Fertility and sterility* 2011;96: 150-155.e155.
- Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, Takada Y, Aggarwal BB. Redox regulation of apoptosis by members of the TNF superfamily. *Antioxidants & redox signaling* 2005;7:482-496.
- Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *Journal of biochemistry and molecular biology* 2006;39: 469-478.
- Simón C HJ, Pellicer A, García-Velasco J. El endometrio humano. Desde la investigación a la clínica. In Panamericana E (ed). 2009.

- Simon C, Martin JC, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Bailliere's best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 2000;14: 815-826.
- Simon C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohi J, Pellicer A. Coculture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1999;84: 2638-2646.
- Simon C, Oberye J, Bellver J, Vidal C, Bosch E, Horcajadas JA, Murphy C, Adams S, Riesewijk A, Mannaerts B *et al.* Similar endometrial development in oocyte donors treated with either high- or standard-dose GnRH antagonist compared to treatment with a GnRH agonist or in natural cycles. *Human reproduction (Oxford, England)* 2005;20: 3318-3327.
- Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F, Carrera J, Vilella F, Pellicer A, Simón C. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeat implantation failure. *Fertility and sterility* 2013;100: 818-824.
- Singh H, Aplin JD. Adhesion molecules in endometrial epithelium: tissue integrity and embryo implantation. *Journal of anatomy* 2009;215: 3-13.
- Smith SK. Angiogenesis and implantation. *Human reproduction (Oxford, England)* 2000;15 Suppl 6: 59-66.
- Soriano D, Lipitz S, Seidman DS, Maymon R, Mashiach S, Achiron R. Development of the fetal uterus between 19 and 38 weeks of gestation: in-utero ultrasonographic measurements. *Human reproduction (Oxford, England)* 1999;14: 215-218.
- Speroff L, Darney PD. *A clinical guide for contraception*. 5th edn, 2001. Lippincott Williams & Wilkins.
- Stanford JB, Mikolajczyk RT. Mechanisms of action of intrauterine devices: update and estimation of postfertilization effects. *American journal of obstetrics and gynecology* 2002;187: 1699-1708.
- Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A, May LT. Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Human reproduction (Oxford, England)* 1995;10: 2793-2799.
- Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA *et al.* Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying

- biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006;147: 1097-1121.
- Tamaya T, Murakami T, Okada H. Concentrations of steroid receptors in normal human endometrium in relation to the day of the menstrual cycle. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 1986;65: 195-198.
- Taube SE, Clark GM, Dancey JE, McShane LM, Sigman CC, Gutman SI. A perspective on challenges and issues in biomarker development and drug and biomarker codevelopment. *Journal of the National Cancer Institute* 2009;101: 1453-1463.
- Teles A, Zenclussen AC. How cells of the immune system prepare the endometrium for implantation. *Seminars in reproductive medicine* 2014;32: 358-364.
- Treloar Ae Fau - Boynton RE, Boynton Re Fau - Behn BG, Behn Bg Fau - Brown BW, Brown BW. Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. 12 1967;International journal of fertility.
- Trussell J. Understanding contraceptive failure. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology* 2009;23: 199-209.
- Tsuzuki T, Okada H, Cho H, Shimoi K, Miyashiro H, Yasuda K, Kanzaki H. Divergent regulation of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and vascular endothelial growth factor by hypoxia and female sex steroids in human endometrial stromal cells. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2013;168: 95-101.
- Uriu-Adams JY, Keen CL. Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular aspects of medicine* 2005;26: 268-298.
- Viguerie N, Montastier E, Maoret JJ, Roussel B, Combes M, Valle C, Villa-Vialaneix N, Iacovoni JS, Martinez JA, Holst C *et al.* Determinants of human adipose tissue gene expression: impact of diet, sex, metabolic status, and cis genetic regulation. *PLoS genetics* 2012;8: e1002959.
- Wang JM, Gu Y, Zhang Y, Yang Q, Zhang X, Yin L, Wang J. Deep-sequencing identification of differentially expressed miRNAs in decidua and villus of recurrent miscarriage patients. *Archives of gynecology and obstetrics* 2016;293: 1125-1135.
- World Health Organization Scientific Group. Mechanism of action, safety and efficacy of intrauterine devices. Geneva: World Health Organization; 1987. Technical report series No.: 753.

- World Health Organization. Long term safety and effectiveness of copper-releasing intrauterine devices: a case study. 2008. Available from: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO\\_RHR\\_HRP\\_08.08\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_RHR_HRP_08.08_eng.pdf)
- Wienke EC, Jr., Cavazos F, Hall DG, Lucas FV. Ultrastructure of the human endometrial stroma cell during the menstrual cycle. *American journal of obstetrics and gynecology* 1968;102: 65-77.
- Wu J, Wang L, He J, Zhu C. In vitro cytotoxicity of Cu(2)(+), Zn(2)(+), Ag(+) and their mixtures on primary human endometrial epithelial cells. *Contraception* 2012;85: 509-518.
- Wynn RM, Harris JA. Ultrastructural cyclic changes in the human endometrium. I. Normal preovulatory phase. *Fertility and sterility* 1967;18: 632-648.
- Wynn RM. *The human endometrium: cyclic and gestational changes*. 2nd edition edn, 1989, New York.
- Ylikorkala O. Prostaglandin synthesis inhibitors in menorrhagia, intrauterine contraceptive device-induced side effects and endometriosis. *Pharmacology & toxicology* 1994;75 Suppl 2: 86-88.
- Yoo HJ, Barlow DH, Mardon HJ. Temporal and spatial regulation of expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the human endometrium: a possible role in blastocyst implantation. *Developmental genetics* 1997;21: 102-108.
- Zhang PC, Fan RQ, Chen XM. [Changes of peroxidase, plasminogen and fibrinolytic activity on menorrhagia induced by IUDS and the effect of treatment with vitamin E]. *Sheng zhi yu bi yun = Reproduction and contraception* 1987;7: 59-61, 23.
- Zhu W, Zhou K, Zha Y, Chen D, He J, Ma H, Liu X, Le H, Zhang Y. Diagnostic Value of Serum miR-182, miR-183, miR-210, and miR-126 Levels in Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *PloS one* 2016;11: e0153046.



## 12. ANEXOS





# ANEXO I. Proyecto de investigación del desarrollo de una nueva herramienta de diagnóstico de receptividad endometrial aprobado por el comité ético del Centro Hospitalario Universitario Virgen del Rocío.



Servicio Andaluz de Salud  
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

Hospital Universitario VIRGEN DEL ROCÍO.  
Avda. Manuel Siurot s/n 41013 SEVILLA

## INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE CENTRO H.U. VIRGEN DEL ROCÍO

El Comité de Ética de la Investigación de Centro H.U. Virgen del Rocío de Sevilla, en Sesión celebrada el día veintinueve de enero de dos mil catorce (Acta 01/14):

1. Ha procedido a la revisión del proyecto:
  - Código de CEI 2014PI/025
  - Presentado por D. José Horcajadas
  - Titulado: "Creación de un test de marcadores inmunológicos y de receptividad en el endometrio humano (iEMIM) basado en el uso de un microarray dinámico de última generación. Redefinición de la firma molecular de la receptividad endometrial atendiendo también a factores inmunitarios".
2. Tras su valoración procede a emitir **INFORME FAVORABLE** del mismo.

Y para que conste y surta los efectos oportunos se expide la presente certificación en Sevilla, a 26 de febrero de dos mil catorce

Fdo.: Fco. Javier Bautista Paloma  
Presidente del CEI



## **ANEXO II. Consentimiento informado para participar en el estudio**

**Hoja informativa con consentimiento informado para el estudio del efecto del cobre en la receptividad endometrial y la inducción de apoptosis en células estromales de endometrio deciduizado.**

### **DATOS**

Nombre de la paciente: \_\_\_\_\_

Nº de historia: \_\_\_\_\_

Nombre del/a ginecólogo/a: \_\_\_\_\_

### **METODOLOGIA: DESCRIPCIÓN Y PROPÓSITO DEL ANÁLISIS**

El dispositivo intrauterino (DIU) de cobre es un método anticonceptivo seguro y eficaz que sirve, como método anticonceptivo temporal, para evitar un embarazo. Está elaborado de plástico flexible, estando compuesto por una rama vertical y otra horizontal a modo de T. La rama vertical está rodeada de un filamento de cobre, que impide el paso de espermatozoides, pero además del efecto físico, el DIU inerte, induce una reacción contra el cuerpo extraño que provoca que el ambiente uterino se vuelva hostil para la reproducción aumentando su efectividad con la liberación de iones cobre.

Este tipo de dispositivos han demostrado disminuir significativamente la expresión de ciertos genes esenciales para la reproducción humana tales como HOXA10.

La liberación de iones de cobre podría afectar la receptividad endometrial actuando como un efecto anticonceptivo adicional del dispositivo, aunque sin embargo, el posible efecto apoptótico sobre las células endometriales que pudiese ocasionar aún no ha sido descrito.

El principal objetivo es examinar la inducción de la apoptosis por cobre utilizando cultivos primarios de células del estroma endometrial humano (HESC), y evaluar su efecto sobre la receptividad endometrial a nivel molecular.

### **PROCEDIMIENTO**

Se obtienen las muestras endometriales mediante un Pipelle catéter en condiciones estériles del fondo uterino y siguiendo un protocolo estándar por filtración y separación, se obtienen células del estroma endometrial humano (HESC).

La biopsia endometrial se lleva a cabo accediendo al útero mediante una fina cánula y absorbiendo un pequeño cilindro de tejido endometrial. No existe una técnica menos invasiva para obtener la cantidad suficiente de material endometrial, por ello, usted notará algunas molestias derivadas del procedimiento, pudiendo sangrar un poco tras la biopsia, pero es un proceso

habitual sin riesgo añadido. El procedimiento de biopsia tiene un riesgo (<5%) de no obtención de suficiente cantidad y/o calidad de muestra necesaria para el estudio. En este caso se requerirá la toma de una nueva biopsia. Tras la realización del estudio, la muestra de biopsia será destruida por el método convencional.

### **CONFIDENCIALIDAD**

Su identidad y todos los datos personales serán tratados según dispone la LOPD (Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos) y por lo tanto serán confidenciales, salvo que se solicite lo contrario. Se permitirá el acceso, para la revisión de sus registros médicos, a las Autoridades Sanitarias. El personal que acceda a sus datos en el ejercicio de sus funciones quedará sujeto al deber de guardar secreto profesional de forma permanente.

### **UNA VEZ LEÍDO Y COMPRENDIDO LO ANTERIOR, QUEDO INFORMADA DE:**

La indicación, procedimiento, probabilidades de éxito, riesgos y complicaciones de la metodología propuesta.

La disposición del personal sanitario para atender cualquier aspecto de la información que no haya quedado suficientemente claro.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que nos ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha clarificado todas las dudas que le he planteado. Manifiesto que estoy satisfecha con la información recibida y que presto libremente mi conformidad para que se me practique una **biopsia endometrial** en el Centro/Clínica: \_\_\_\_\_ así como que las muestras serán remitidas a la premisa de SINA E S.L, en España, con el fin de que se realice dicho experimento.

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**Firma de la paciente:**

**Firma del ginecólogo/a:**

## ANEXO III. Secuencia de los oligonucleótidos forward y reverso de los 192 genes de la WO1

Gen	Oligonucleótido forward	Oligonucleótido reverso	Gen	Oligonucleótido forward	Oligonucleótido reverso
ABCC3	GGTCTTGCTGAT TCCAACCAAC	GCGCGAGTCCT TCAATTTCA	ACTA1	GCCGTGCTGTC CCTCTAC	CAGCGCTAGCC CTCATAA
ALDH1A3	TCTTCTCACCCT CAGATCAACA	GGACGCAGCTT CTTTAACCA	ACTB	CCAACCGCGAG AAGATGAC	TAGCACAGCCTGG ATAGCAA
AMIGO2	AGGTGCAAGAG TGACAGACA	TCTTCCCAGGTG CTTTTCCA	APOD	CCGGTGCAAGGA GAATTTTGAC	GATGCAGCGTCCA TTCTCAAA
ANGPTL1	CGGCTCTGTCAA CTTCTTCA	CAGTCCAAGCC AGTATTCTCC	APOE	CCAGGTCCACC CAGGAAC	TGTTCTCCAGTT CCGATTTGTA
ANXA2	CCTGGAATGTC TTTCTGAAC	TGGAGTCATACA GCCGATCA	ATP5B	TGTCGATCTGCT AGTCCCTA	TCAGTACAGTCTT GCCAACTCC
ANXA4	CAGGAGATCAG GACAGCCTA	AGTTGCCACTCA GTTCTGAC	B2M	TTAGCTGTGCTC GCGCTAC	CTCTGCTGGATGA CGTGAGTAA
APOL2	TGACTGATGATG AAGCCTGGAA	TACGGAGTCTAT CTGCCTCA	BTC	CTGTGGAGACC CTGAGGAAAA	TGTATTGCTTGGG GCACCTA
AQP3	TACCCCTCTGGA CACTTGGATA	CAACAATGGCCA GCACACA	C2CD4B	CTTGCAACCAGA TCCAGAGAC	GCTAGGAGTGGC GGGAA
AREG	GGTGGTGTCTGT CGCTCTT	GCTTCCCAGAGT AGGTGTCATT	CCL2	TAGCAGCCACCT TCATTCCC	CCTCTGCACTGAG ATCTTCTTA
ARG2	AGCTGTGTCAGA TGGCTACA	GGCATGGCCAC TAATGGTAC	CCR7	TGGTGGCTCT CCTTGTC	CTGTGGTGTGTGTC TCCGATGTA
ARHGDI1	CGTGGTGAAGT GCCTGAC	GCACAAACGACT GCTTCTTGAA	CD55	GTGCAACCATCT CCTTCTCA	CAGAGCTGCCTGA AATAAGACA
C10ORF10	GACTGTCCCTG CTCATCCATT	ACTCTGGCGAG AGGAGGT	CIR1	TCAATGCAAGTT CGGTTCCC	CAAACCCACTGTT TCTCATCTCC
C4BPA	TCTGATGGCGAA TGGGTGTA	CTTGCCCATAC GTAACCTCTCC	CLDN4	TGGCCGGCCTT ATGGTGATA	GCCACCAGCGGA TTGTAGAA
CALCA	AGAGGTGTCAT GGGCTTCCA	TGCTGGGCTGC TCTCCA	CMTM5	AAGGGCATCCT GCTGGAAA	CAGAGATGGAGG CCGTGAA
CALR	GTTCTACGGTGA CGAGGAGAAA	AAACTGGCCGA CAGAGCATA	CRHR2	ACGTGGGCCTC AAAGATCA	ATGCGGTAGTGCA GGTCATA
CAPN6	TGGAAAGGTGG TGTGGAAC	GTCAGCTGGTG GTTGCTAA	CSF1	GGAGACCTCGT GCCAAATTA	TGCCTTCTTAAGG TAGCACAC
CATSPERB	CCCAGCTTGGG AATCATGAA	CCAACCACAAAA TCCGATCAC	CSF3	CCCAGAGCCCC ATGAAG	TGGCTTCTGCAC TGTC
CDA	GCCGTCTCAGA AGGGTACAA	GGCCCCACATG GAGAGATAAA	CXCL1	CTTGCTCAATC CTGCATCC	AGCCACCAGTGAG CTCC
CDH1	AGTGCCAACTG GACCATTCA	TCTAAGGCCATC TTTGGCTTCA	CXCL6	ACGCTGAGAGT AAACCCCAAA	CAAACCTGCTTCC CGTTCTTCA
CLIC1	GACTGCAACCT GTTGCCAAA	GTGAATCCCCG GTACTTCTTACA	CYC1	CCATGGCCCCCT CCCCTCA	GGTGCACACATCC TTGGCTA
CLU	CCAGTACTATCT GCGGGTCCAC	CACGACCACCT CAGTGACA	EGF	TTACTGCACGTG CCCTGTA	CATTGCGTGGACA GGAAACA
COL16A1	GATGAAATCAAG AGGTTTCATCAAC	TGCATCCTGGA GGTGATGA	EMG1	CAGACCCGAATT CCCAGAAC	CTCGAACACTGAG CTTGGTGTA
CRISP3	TAGGGCCAAAG ACTCCCAAC	CCAACGAGGTAT GAAGAGTACCA	EREG	ACAGTCGTCCG TTCCACATA	TCCCCTGAGGTAA CTCTCTCA
CSRP2	TCCAGATGTGG GGATTCTGTA	CACTTTGCACAT CGGAAACA	FAM3B	ATGGGAGAACA GCTGGGAAA	TCGTGTTGCTGTC ACATTCC
CTNNA2	TGGAAATCCCG ACGCTAACA	GCCTTTGTTGCT TGTGTTGAC	FAM3D	GCCTCCTACGA CGATCCA	CGTAGGAACTCCC CAAGTCA
CXCL14	TGCTGCTGGCG CTGTA	AGCTTCTTACAG TCGCTGTA	FASLG	TGGGGATGTTTC AGCTCTTCC	CTGTGTGCATCTG GCTGGTA
DEFB1	CAGTCGCCATG AGAATTCTC	AGAATAGAGACA TTGCCCTCCA	FGF7	AAAGGGACCCA AGAGATGAAGAA	CACCCCTTTGATT GCCACAA
DKK1	CGGGCGGGAAT AAGTACCA	GGACTAGCGCA GTACTCATCA	FOXO1	GGTGTGAGGCT GAGGGTTA	TTCTCTCAGTTCC TGCTGTCA
EPHB3	TCGGCCAGTTAT	CAGCTGGATGA	FOXP3	TGTGGGGTAGC	GGGTGCGATGTTG

Gen	Oligonucleótido forward	Oligonucleótido reverso	Gen	Oligonucleótido forward	Oligonucleótido reverso
	GATCCTCA	CCGTGAAC		CATGGAAA	TGGAA
ESR1	GACAGGGAGCT GGTTCACA	GACCTGATCATG GAGGGTCAAA	FUT4	TTCAACTGGACG CTCTCTAC	TGGCTTCTGGGGT AGAGGTA
ESR2	AGTCCCTGGTGT GAAGCAA	CGCAACGGTTC CCACTAAC	GAPDH	GAACGGGAAGC TTGTCTACAA	ATCGCCCACTTG ATTTTGG
EZR	AGAGCTGGAGT TTGCAATCC	CCGGAGGCCGA TAGTCTTTA	GJA4	CATCGTCCCCAC CTCCA	CACCGTCAGCCAG ATCTTAC
FZD5	TGGGGACTGTC TGCTCTTCT	TGGGGAGAGAC GGTTAGGG	HBA1	TCTCTGCCGAC AAGACCAA	GTGGTGGGGAAAG GACAGGA
GABARAPL 1	ATCCCTCCCACC AGTGCTA	TCTCATCACTGT AGGCCACATAC	HBG1	GCAAGAAGGTG CTGACTTCC	GCTTGTACAGTG CAGTTCA
GADD45A	GCGACCTGCAG TTTGCAATA	CTTTCGGTCTTC TGCTCTCCA	HMBS	AGAGTGATTCCG GTGGGTA	CTTTCATGTTGC CACCACAC
GAST	CCCAGCCTCTCA TCATCGAA	GCCGAAGTCCA TCCATCCATA	HOXB7	TTCCGGATCTAC CCCTGGAT	TCTGGTAGCGGGT GTAGGT
GDF15	GAAGATTGCAAC ACCGACCTC	AGATACGCAGG TGCAGGT	HPRT1	GCTTTCCTTGGT CAGGCAGTA	ACTTCGTGGGGTC CTTTTCAC
GNLY	GACCTGTCTGAC GATAGTCCAA	GGTCGCAGCAT TGGAAACA	ICAM1	CCCCTACCAGCT CCAGACC	TGCCGTGCCACCT CTAGGAC
GPX3	TTTGTCAACGTG GCCAGCTA	AAAGCCCAGAAT GACCAGACC	IFNG	ACTGCCAGGAC CCATATGTAA	GTTCATTATCCG CTACATCTGAA
HBEGF	CTGCATCATGG AGAATGCAAA	GCCCATGACAC CTCTCTCC	IGFBP3	CGAGTCCAAGC GGGAGAC	GGGACTCAGCACA TTGAGGAA
HOXA10	CCCTTCCGAGA GCAGCAA	CCAGTTGGCTG CGTTTTCA	IL10	CCGTGGAGCAG GTGAAGAA	GTCAAACCTACTC ATGGCTTTGTA
HOXA11	CGGCCACACTG AGGACAA	CTGAAGAAGAAC TCCCGTTCCA	IL11	GCTGCACCTGA CACTTGAC	GGTCACAGCCGA GTCTTCA
HPSE	TCCTGAAGGCT GGTGGAGAA	GGTAGCAGTCC GTCCATTCAAA	IL18	ACCAAGGAAATC GGCCTCTA	ACCTCTAGGCTGG CTATCTTTA
ID4	CGCTCACTGCG CTCAA	GCTCAGCGGCA CAGAA	IL1B	GACCTGAGCAC CTTCTTTCC	CGTGCACATAAGC CTCGTTA
IDH1	GCTTCATCTGGG CCTGTAAG	ATCATGCCGAGA GAGCCATA	IL1R1	GGGCAAGCAAT ATCCTATTACCC	TAGCTGGGCTCAC AATCACA
IER3	GCAGCCGCAGG GTTCTCTA	CTTTTGGCTGGG TTCGGTTCC	IL2	ACCCAGGGGACT TAATCAGCAA	GCATATTCACACA TGAATGTTGTTTC A
IGFBP1	CCTGCCAAACTG CAACAAGAA	TCCTCTTCCCAT TCCAAGGGTA	IL21	CTGAATTTCTGC CAGCTCCA	TTGTTTCCTGTATT TGCTGACTTTA
IL15	GTCCGGAGATG CAAGTATTA	TCCTCACATTCT TTGCATCCA	IL4	CAGCTGATCCG ATTCTGAA	GTGGGCTTCTTC ACAGGAC
ITGAV	TAACCAGTTTAC GCCTGCTA	CTTCCAGCTTGG GTTTACAGAC	IL5	ACTCTGAGGATT CCTGTTCTGTA	CCAGTGTGCCTAT TCCCTGAAA
KCNG1	AACCTCTCCGTC AGCACCTT	GTTGTGGCACAT CTGGGAACA	IL6	AGAGCTGTGCA GATGAGTACAA	GTTGGGTCAGGG GTGGTTA
LEP	CACCAAAACCCT CATCAAGACAA	AGCCCAGGAAT GAAGTCCAA	IL8	ACACTGCGCCA ACACAGAAA	CACTTTTCCCTTGG GGTCCAGAC
LIF	CTCGGGTAAGG ATGTCTTCCA	ACACGGCGATG ATCTGCTTA	ITGA2	TGCCCCGAGCA CATCATTTA	CTGATGTCCACAC GCAAAATCC
LRPPRC	ACGCAAGTTAG GCGGGATTA	GGGTCTGCTGC TGATCCAATA	ITGA8	CTGTAGCGCAG GTGGAAATA	TCCTCTTCTGGTT CCAGTTA
LRRC17	AGATGAGCTTGT GGCATCCA	GCAGTTCTGGAA CAATGAGACC	ITGA9	AAATGCAGCGT GGGATTTC	CCAGACAGGTGG CTTGATCA
LYPD3	CGCCAGCGATC ATGTCTACA	CAGGCAAGGAC ACAGTCACA	ITGB1	GAATGTATACAA GCAGGGCCAAA	CGTGCAGAAGTAG GCATTCC
MAOA	ATGGTCTCGGG AAGGTGAC	GGTGATTTCTAC CGCTGGAAC	ITGB3	CGGGCAGTGTC ATGTTGGTA	TCATCAGCCCCAA AGAGGGATA
MFAP5	GATGTGACTCAA GCGACTCCA	CTGTTTCACTCG TAGCGGGATCA	LCP1	ACAAACCGCCAT ACCCCAA	CCCCAATTCTACC CGTGATTA
MMP10	TGAGCCTAAGGT TGATGCTGTA	GGCATTGGGGT CAAACCTCAA	LIFR	GGCCCGAGAGAA GAGTATGTA	ACTGCCACTGGGA TGAGAA
MMP26	CCAGGAAGATG CAAGTGGA	CTGCGGATGGC TTCATATCA	LPAR3	GGAGGACACCC ATGAAGCTAA	GGGGTCCAGCATA CCACAA
MMP8	TGCCGAAGAAA	AGCCCCAAAGA	MAP2K1	CTGAGGGAGAA	TCCCCACGGGAGT

Gen	Oligonucleótido forward	Oligonucleótido reverso	Gen	Oligonucleótido forward	Oligonucleótido reverso
	CATGGACCAA	ATGGCCAAA		GCACAAGATCA	TGACTA
MT1E	GGCTCCTGCAA GTGCAA	CACGGGGCAGC AGGAA	MAP3K5	ATCATTCCGGAAG GCGGTACA	ACTCTCAGATGCA AGGCTGAA
MT1F	TCCTCGGCTTGC AATGGA	CTTTGCACCTTGC AGGAACCA	MAPK1	TTGGTACAGGG CTCCAGAAA	TCTGCCAGAATGC AGCCTA
MT1G	GTGCACCCACT GCCTCTTC	AGGAGCAGTTG GGGTCCATT	MAPK3	GAAGATCAGCC CCTTCGAACA	GCAGCAGGATCTG GATCTCC
MT1H	GCTCCTGCAAGT GCAAAA	GCAGCTGCACCT CTCTGAC	MAPK8	TCTCCAACACCC GTACATCA	CCCTTTCATCTAA TGCTTGTCA
MT1L	CAGCTCCTGCAA GTGCAA	GACGCCCTTT GCAGAC	MMP2	ATGATGGAGAG GCAGACATCA	AGTCCGTCCTTAC CGTCAA
MT2A	CCAGGGCTGCA TCTGCAA	GTGGAAGTCGC GTTCTTTACA	MMP9	AGTGGCACCAC CACAACA	GCAAGGCGTCGT CAATCA
MUC1	TAGCAGTACCGA TCGTAGCC	CCACTGCTGGG TTTGTGTAA	MT1X	CCTCGAAATGGA CCCCAACT	GCACCTTTGTCAT TTGCAGGA
MUC16	TCAACGCCACA GAGAGAGAA	GCAGCCTGAATA GAGGTATTCC	NFKB1	CTACCTGGTGC CTCTAGTGAA	ACCTTTGCTGGTC CCACATA
MUC4	AAAACCTACGAGC AGGCGAAC	CCCTTGTAGGCT TCAATCACAC	NFKBIA	CACCTCCACTCC ATCCTGAA	GGTAGCCATGGAT AGAGGCTAA
MUC5B	AGTCCATGGATA TCGTCTCAC	GCTCACC GGAA TTTGGTCAA	NFKBIE	GCTGGAAGCAC TCACTTACA	CTGGGCGCTCATG AATCAC
NNMT	ACTCTGCAGAAA GCCAGATCTTA	ATCAGCAGGTCT CCCTTCAC	PLA2G4A	AGGCTCCACAAT GGAGGAA	TCATCATCACTGT CCGACTA
OPRK1	CCTTGGAGGCA CCAAAGTCA	GGTCCCACCAG GAGTAGTCA	PPP2R2C	AGCTGCCCTGT GTGACAA	TCCGAGAAGAATG AGCGGTTA
PAEP	AGGGTCCACAT CACCTAC	CCAAGGACCTTC TTCTCAACAC	PRKCG	TCACCGCTCGCT TCTTCAA	CAGGCCCTGCTTT CGGATA
PGR	AGCCAAGAAGA GTTCTCTGT	TTGACTTCGTAG CCCTTCCA	PTGER3	GTCGGTCTGCT GGTCTCC	TGTGTCTTGCAGT GCTCAAC
PGRMC1	GGCAAGGTGTT CGATGTGAC	CTCTTCCAGCAA AGACCCATA	PTGFR	CGTCTTCTGCTC CTCAGAGA	CTCAAACTGTGC AGGATTGC
PLA2G16	AACTCGAGCA CTTTGTGAA	GCTTGACGCA TGATGACA	PTGS1	GCGGCTCTTTAA GGATGGGAA	AACACAGGCGCCT CTTCTAC
PRDX1	TGGGGTCTTAAA GGCTGATGAA	GTGATCTGCCG AAGAATACCC	PTGS2	TTCCCTTCCTTC GAAATGCA	TTGTAAGTTGGTG GACTGTCA
PRDX2	GCTCATTTGGC GCTGAGAA	TACCGGAGGCC ATGACTGAA	PTPRZ1	CACCCAGACAA CAAGCACAA	AGCAAGCTGTGCT AGCTTAAC
PROK1	TTGCCTTACCC CAAGTGAC	ACTGGACATCCC GCTCACA	RAC1	TCACCTATCCGC AGGGTCTA	GCCGAGCACTCCA GGTATTTTA
S100A1	GCTGAGCAAGA AGGAGTGAA	TGTCCACAGCAT CCACATCC	RACGAP1	GTTCCATTGGCT CTGCAGTA	GCCATCATTGGGA ACAGTCA
S100A10	ACAAAGGAGGA CCTGAGAGTAC	AGCCCACTTTGC CATCTCTA	RHOA	GTGCCCACAGT GTTTGAGAA	TGTGTCCACAAA GCCAAC
S100A2	TGGCTGCCTTG CTCTCC	TGGCAGGAGTA CTTGTGGAA	RPL13A	GAGGGCCCTAC CACTTCC	GCCGTCAAACACC TTGAGAC
S100P	GAAGGAGCTAC CAGGCTTCC	AGCAATTTATCC ACGGCATCC	SCGB3A1	CCCGCGCCATG AAGCT	CTTGGCCGAGCC CACTAAG
SCGB2A2	CTCTCCCAGCAC TGCTAC	CTTGTGGATTGA TTGTCTTGAA	SDHA	ACATCGGAAGTG CGACTCA	TTCTTGCAACACG CTTCCC
SERPINA1	CCACGATATCAT CACCAAGTTCC	TTGACCCAGGA CGCTCTTCA	SELL	CTCAATGGGCT GCAGAAGAACTA	TCTGGGTGCTCTG ACATTTCC
SERPING1	TGGCCCATTTCA TTGACCAAAC	TGGGGTACCAG GATCACCAA	STAT3	GGAAATAATGGT GAAGGTGCTGA AC	CCGAGGTCAACTC CATGTCAAA
SGK1	CTTGGGCTACCT GCATTAC	TGTGTCCCTGTG AATCTAGCA	STC1	TGTACAGCGCT GCTAAATTTGAC	CCCCTTGGCGATG CATTTTA
SLPI	AAATGCCTGGAT CCTGTTGAC	CATAAGTCACTG GGCACTTCC	TBP	TGCCCGAAACG CCGAATATA	CGTGGTTCGTGGC TCTCTTA
SOD2	AGGAACGGGGA CACTTACAA	TCAATCCCCAGC AGTGAATA	TFF3	GGCCTTGCTGT CCTCCA	CCCGTTGTTGCA CTCC
SPDEF	CACAGCTATGG CCGCTTCA	GGCTCAGCTTGT CGTAGTTCA	TGFB1	CGTCTGCTGAG GCTCAAGTTA	TCGCCAGGAATTG TTGCTGTA
SPP1	AGAAGTTTCGCA	CCATTCAACTCC	TNC	CAACCATCACTG	AGGGCAGTTCCG

Gen	Oligonucleótido forward	Oligonucleótido reverso	Gen	Oligonucleótido forwardo	Oligonucleótido reverso
	GACCTGACA	TCGCTTTCC		CCAAGTTCAC	ACTGAAC
STMN1	TGCCTGTCGCTT GTCTTCTA	CTGAGGCACGC TTCTCCA	TNF	CCCAGGGACCT CTCTCTAATCA	ATGGGCTACAGGC TTGTCAC
TAGLN2	CTGGACGCGAG AACTTCCA	CCTCGGGGTAC AGTGCATTAA	TNFRSF1 1B	TGTTCCGGAAAC AGTGAATCAA	ACCTGAAGAATGC CTCCTCA
TSPAN8	GCCACAGGGGA AAGTGAAAA	AGCAGCTCCATT GACCAAAC	TOP1	ACGCTACAGCA GCAGCTAA	AGCTCGATTGGCA CGGTTA
VCAM1	CAGGCTGGAAG AAGCAGAAA	CACTCTCAGAAG GAAAAGCTGTA	WISP2	TGAGAGGCACA CCGAAGAC	CGGGCACAGCTG GGTA
VEGFA	GAGGAGGGCAG AATCATCAC	GTCTCGATTGGA TGGCAGTA	YWHAZ	AGACAGCACGC TAATAATGCA	AGCTTCGTCTCCT TGGGTA

**Anexo IV. Validación de los oligonucleótidos diseñados por PCR. Se indica el nombre del gen amplificado, la temperatura de hibridación (TH) teórica, la TH validada, la longitud del producto de PCR (amplicón).**

Nombre del gen	TH teórica	TH validada	Amplicón	Nombre del gen	TH teórica	TH validada	Amplicón
ABCC3	57,25	57	85	MT1L	54,25	56	114
ALDH1A3	56,35	56	78	MT2A	56,45	56	97
AMIGO2	55,4	56	142	MUC1	56,45	56	83
ANGPTL1	56,85	55	82	MUC16	57,25	59,2	83
ANXA2	56,35	56	80	MUC4	57,25	57,3	82
ANXA4	56,45	56	79	MUC5B	57,25	57	83
APOL2	57,4	57	75	NNMT	58,15	56	88
AQP3	56,7	58,4	91	OPRK1	58,5	53,6	86
AREG	57,25	57	80	PAEP	57,8	57	101
ARG2	56,45	56	79	PGR	56,35	56	75
ARHGDI	57,5	57	101	PGRMC1	58,3	56	76
C10ORF10	56,85	55	77	PLA2G16	53,85	56	81
C4BPA	57,25	57,7	79	PRDX1	57,8	58,5	81
CALCA	55,85	57	120	PRDX2	57	57	91
CALR	57,25	55,2	78	PROK1	57	57	115
CAPN6	54,85	55	84	S100A1	57,9	58	86
CATSPERB	55,9	55	84	S100A10	57,25	57	127
CDA	57,9	54	84	S100A2	54,8	53	125
CDH1	56,35	56	74	S100P	57,95	57	60
CLIC1	57,65	55,9	65	SCGB2A2	55,85	55	76
CLU	58,4	58	82	SERPINA1	58,7	59	112
COL16A1	57,45	57	80	SERPING1	57,4	60	88
CRISP3	58,7	57	73	SGK1	56,95	57	80
CSRP2	54,9	55	89	SLPI	57,35	57	70
CTNNA2	55,9	56	86	SOD2	55,9	56	88
CXCL14	52,85	54	94	SPDEF	57,4	57	133
DEFB1	57,4	57	149	SPP1	57,35	57	85
DKK1	57,4	55,9	94	STMN1	55,4	53	75
EPHB3	55,95	57,5	94	TAGLN2	57,4	57	78
ESR1	57,8	58,5	78	TSPAN8	55,4	53	90
ESR2	55,4	52	88	VCAM1	56,75	54,5	88
EZR	56,45	56	79	VEGFA	56,45	55,5	76
FZD5	58,05	56,6	78	ACTA1	57,1	55,5	102
GABARAPL1	58,2	56	88	ACTB	55,95	56	80
GADD45A	56,85	55,9	63	APOD	57,35	57	93
GAST	57,9	55,2	127	APOE	57,9	58	82
GDF15	55,7	55,2	97	ATP5B	58,7	56	80



Nombre del gen	TH teórico a	TH validad a	Amplicó n	Nombre del gen	TH teórico a	TH validad a	Amplicó n
GNLY	56,7	60	79	B2M	57,8	54,5	90
GPX3	56,85	57	102	BTC	56,85	57	86
HBEGF	57,95	55,9	92	C2CD4B	56,25	57	65
HOXA10	54,85	55	76	CCL2	58,3	56	104
HOXA11	57,25	57	110	CCR7	57,8	58,5	82
HPSE	58,3	55	74	CD55	56,35	56,5	84
ID4	50,3	45	73	CIR1	57,65	58	87
IDH1	55,4	56	82	CLDN4	57,5	57	79
IER3	59,45	59,4	73	CMTM5	55,4	54	73
IGFBP1	57,75	57,7	110	CRHR2	54,85	54,5	83
IL15	55,4	55	110	CSF1	55,9	55,5	79
ITGAV	55,95	55	89	CSF3	53	52,6	75
KCNG1	57,9	56	75	CXCL1	56,45	57	105
LEP	56,75	54,3	108	CXCL6	56,85	58	110
LIF	56,85	57	77	CYC1	58,05	58	89
LRPPRC	56,85	57	73	EGF	54,85	54	80
LRRC17	57,25	57	82	EMG1	57,4	57	76
LYPD3	57,5	57	80	EREG	56,85	55,5	95
MAOA	57,4	57	80	FAM3B	55,4	55,5	84
MFAP5	59,1	61,5	76	FAM3D	56,45	56	76
MMP10	56,35	55	88	FASLG	58,4	59	75
MMP26	55,4	55	79	FGF7	56,75	57	84
MMP8	55,9	55,5	84	FOXO1	56,45	56,5	76
MT1E	52,95	54	69	FOXP3	53,7	56	80
MT1F	54,25	54	80	FUT4	57,4	57	74
MT1G	58,05	56	77	GAPDH	55,9	58	79
MT1H	53,65	53	128	GJA4	55,85	56	142
PLA2G4A	55,35	55	81	PPP2R2C	54,75	54	75
HBA1	58,05	56,5	110	PRKCG	55,4	54	80
HBG1	56,45	56,5	96	PTGER3	56,55	56	81
HMBS	55,35	58,5	76	PTGFR	56,95	57,5	79
HOXB7	56,9	57	76	PTGS1	57,9	58	84
HPRT1	58,3	56	76	PTGS2	53,9	54	79
ICAM1	60,15	57	81	PTPRZ1	55,9	55	81
IFNG	57,6	57,5	85	RAC1	58,3	56	67
IGFBP3	58	58	91	RACGAP1	55,4	55	77
IL10	57,65	58,5	74	RHOA	54,85	55	78
IL11	56,5	54,5	63	RPL13A	56,45	56	119
IL18	56,35	56	110	SCGB3A1	55,7	56	89
IL1B	56,45	54,5	82	SDHA	54,3	58	81
IL1R1	57,65	57,5	89	SELL	59,1	57,8	77
IL2	57,8	54,5	81	STAT3	60,1	59	79
IL21	55,8	56,5	103	STC1	56,75	55,5	74
IL4	56,95	57,5	84	TBP	56,45	57	73
IL5	59,8	56	79	TFF3	54,2	54	128
MAPK3	58,9	56	68	NFKBIE	55,95	54,5	74
MAPK1	54,85	55	87	NFKBIA	58,3	58	76

Nombre del gen	TH teórica	TH validada	Amplicón	Nombre del gen	TH teórica	TH validada	Amplicón
IL6	56,9	55	89	TGFB1	57,35	57	75
IL8	58,2	58	75	TNC	58,3	58	82
ITGA2	56,85	57	74	TNF	59,25	60	84
ITGA8	55,9	56	82	TNFRSF11 B	55,4	54	73
ITGA9	56,85	57,1	83	TOP1	54,3	57	87
ITGB1	57,8	59	80	WISP2	54,65	55	80
ITGB3	58,3	56	77	YWHAZ	54,35	58	76
LCP1	57,25	55	74	MAPK8	56,75	57	92
LIFR	55,9	55	80	MMP2	55,9	56	82
LPAR3	57,4	57	70	MMP9	53,7	57	82
MAP2K1	57,8	58	71	MT1X	56,95	57	79
MAP3K5	55,9	55	81	NFKB1	57,25	57	80

**ANEXO V. Parejas de oligonucleótidos diseñados por GeneFisher 2.6 para los genes no validados.** Se indican el símbolo del gen (gen), la secuencia de los oligonucleótidos, el nivel de calidad(QS, quality score), la longitud del fragmento de PCR teórico (PL, product length), la diferencia de temperatura entre los oligonucleótidos (TD,) y la posición de los mismos en la secuencia de RNAm (FPPos/RPpos).

Gen	Oligonucleótido delantero	Oligonucleótido reverso	QS	PL	TD	FPPos. / RPpos.
CXCL14	TGTGTGAGCGAGA GGGTAG	GCAGAACCACTC GGTGAC	74 5	167	0	50/199
MFAP5	GAAAGAGCAGAAC ACCATAGAC	CACCAGATTAGG ATCTTCTGTG	74 5	172	0	188/33
CDA	AGCCTACTGCCCC TACAG	TGCCCTGAAATC CTTGTAAC	74 4	169	0	262/41 1
S100P	TCAAGGTGCTGAT GGAGAAG	AGTACTTGTGAC AGGCAGAC	74 5	168	0	191/33 9
MPP8	GATCATGTTCTCC CTGAAGAC	GTGCCATTCTTC CTTGTAAGAC	74 5	171	0	95/245
AMIGO2	AAGGTGCAAGAGT GACAGAC	TTCACAATAGGG AGCTCTGTG	74 4	167	0	392/53 8
PRDX1	GAGTCCGAGACTG CTTGAG	CTGACCATCTGG CATAACAG	74 4	167	0	249/33 9
IGFBP1	CTGATGGCCCCCTT CTGAAG	TGATGTCTCCTG TGCCTTG	74 4	165	0	710/85 6
MT1H	TTGCAATGGACCC CAACTG	GACGCCCCCTTTG CAGATG	74 5	166	0	66/214
ACTA1	CTGGTGAAAGCCG GCTTC	GATAGGTACTT CAGGGTCAG	74 4	168	0	156/30 3
IL10	CAACCTGCCTAAC ATGCTTC	CTCCAGGTAAAA CTGGATCATC	74 5	172	0	163/31 3
CXCL1	TGCTCCTGCTCCT GGTAG	TGGCTATGACTT CGGTTTGG	74 4	168	0	140/28 8
HMBS	CAACGGCGGAAGA AAACAG	CAAGAATCTTGT CCCCTGTG	74 4	168	1	182/33 0
IL1B	TGCTCTGGGATTC TCTTCAG	GTCCTGGAAGGA GCACTTC	74 5	167	0	34/182
B2M	TTCGGGCCGAGAT GTCTC	GATGGATGAAAC CCAGACAC	74 4	169	1	49/198
EMG1	TAGGGGCAGGAAA CAAGATC	GATATCTGGCCG CGCTTC	74 5	167	0	237/38 6
PTPRZ1	CTCCACTCTGAGA AGCAGAG	CCAGCCAATCTC TTCAACAAG	74 5	169	0	340/48 8
AREG	GGGGAGGAGGAT GGAGATG	CACGTGGATTGT CTTCTGTC	74 5	170	1	174/32 4

<b>Gen</b>	<b>Oligonucleótido delantero</b>	<b>Oligonucleótido reverso</b>	<b>QS</b>	<b>PL</b>	<b>TD</b>	<b>FPPos. / RPPos.</b>
IL21	CACTGGTCCACAA ATCAAGC	CAGGAAAAAGCT GACCACTC	74 5	169	0	110/25 9
IL1R1	GGCAGGAATGTGA CAATCG	GAGGGAGTCACC ATCTTCAG	74 4	167	0	111/ 258
CMTM5	GGCATCCTGCTGG AAACC	CCAGTTAATTCG GTCGAAGC	74 5	168	0	546/69 4
IFNG	GGCTTAATTCTCTC GGAAACG	GAGTTCCATTATC CGCTACATC	74 5	172	0	105/25 5
CXCL14	TGTGTGAGCGAGA GGGTAG	GCAGAACCACTC GGTGAC	74 5	167	0	50/199

## ANEXO VI. URL de las direcciones web utilizadas en la tesis doctoral

Pagina web	Url
Motor de busqueda Pubmed	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>
Oligonucleotidos de Fluidigm	<a href="http://www.fluidigm.com/d3-assay-design.html">http://www.fluidigm.com/d3-assay-design.html</a>
Programa informático Genefisher	<a href="http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/submission.html">http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher2/submission.html</a>
Nucleótidos en la base de datos del NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide</a>
Blastn en la base de datos del NCBI	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&amp;PROGRAM=blastn&amp;MEGA-BLAST=on&amp;BLAST_PROGRAMS=MegaBlast&amp;PAGE_TYPE=BlastSearch&amp;SHOW_DEFAULTS=on">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&amp;PROGRAM=blastn&amp;MEGA-BLAST=on&amp;BLAST_PROGRAMS=MegaBlast&amp;PAGE_TYPE=BlastSearch&amp;SHOW_DEFAULTS=on</a>
Recursos bioinformáticos DAVID	<a href="https://david.ncifcrf.gov/">https://david.ncifcrf.gov/</a>

## ANEXO VII. Publicaciones del doctorando

### Artículos científicos:

**Carrascosa JP**, Cotán D, Jurado I, Oropesa-Ávila M2, Sánchez-Martín P, Savaris RF, Sánchez-Alcázar JA, Tan SL, Horcajadas JA. The effect of copper on endometrial receptivity and induction of apoptosis on decidualized endometrial stromal cells (aceptado por Reproductive Sciences). 2017.

Enciso M\*, **Carrascosa JP\***, Sarasa J, Martínez-Ortiz PA, Cotán D, García-Martín S, Munné S, Aizpurúa J, Horcajadas JA. ER Map: a new comprehensive and reliable endometrial receptivity test (enviado a Molecular Human Reproduction). 2017

\*Co-autores (han contribuido por igual)

Villanueva-Paz M, Cordero MD, Pavón AD, Vega BC, Cotán D, De la Mata M, Oropesa-Ávila M, Alcocer-Gomez E, de la Vera I, Garrido-Maraver J, **Carrascosa JP**, Zaderenko AP, Muntane J, De Miguel M, Sánchez Alcazar. Amitriptyline induces mitophagy that precedes apoptosis in human HepG2 cells. *Genes Cancer*, 7 (7-8): 260-277. Jul 2016

### Capítulo de libro:

**Carrascosa JP**, Moreno-Moya J, Horcajadas JA. 2017. The molecular signature of the endometrial receptivity research and clinical application. *Reproductomics: the omics revolution and its impact on human reproductive Medicine*. Elsevier. (Enviado).

## **ANEXO VIII. Comunicaciones a congresos relacionados con la tesis**

The Effect of Copper on Endometrial Receptivity and Induction of Apoptosis on Decidualized Endometrial Stromal Cells.

64th Annual Meeting of the Society of Reproductive Investigation.

Orlando, EEUU, 2017.

Poster.

ER Map: a new comprehensive and reliable endometrial receptivity test.

33rd Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology.

Helsinki, Finlandia, 2016.

Comunicación oral.

ER-Map Allows the Reliable Determination of the Window of Implantation in Infertile Women". 72nd Annual Meeting American Society for Reproductive Medicine.

Salt Lake City, EEUU, 2016.

Poster.

ER-Map: Re-defining the Transcriptomic Signature of Endometrial Receptivity.

Validation of a New Method for Endometrial Receptivity Evaluation.

32nd Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology.

Lisboa, Portugal, 2015.

Poster.

Transcriptome Difference between Topic and Ectopic Pregnancy in First Trimester Using Peripheral Blood. Paving the Road for Biomarkers of Ectopic Pregnancy.

60th Annual Meeting of the Canadian Fertility and Andrology Society.

Quebec, Canada, 2014.

Comunicación oral.

Induction of Apoptosis on Endometrial Stromal Cells Under Treatment with Copper.

60th Annual Meeting of the Canadian Fertility and Andrology Society.

Quebec, Canada, 2014.

Poster.

Induction of Apoptosis on Endometrial Stromal Cells Under Treatment with Copper.

61st Annual Scientific Meeting of Society for Gynecological Investigation.  
Florence, Italia, 2014.  
Poster